



Universidad Autónoma
de Madrid

**IDENTIFICACIÓN DE MicroARNs COMO
BIOMARCADORES DE GRAVEDAD Y
RESPUESTA AL TRATAMIENTO EN
PACIENTES CON PSORIASIS.**

Autor: Pablo Chicharro Manso.

Dirección de Tesis: Dra. Hortensia de la Fuente Flores, Dra. Mar Llamas Velasco.

Tutoría de Tesis: Dr. Esteban Daudén Tello.

Fecha de finalización del manuscrito: enero de 2021.

Agradecimientos:

A las doctoras Hortensia de la Fuente Flores y Mar Llamas Velasco, por su insustituible ayuda durante todo el desarrollo de esta tesis doctoral.

Al doctor Esteban Daudén, por ser un referente y una motivación constantes.

A mi compañero y amigo, el doctor Pedro Rodríguez Jiménez, por formar conmigo el mejor equipo posible.

A todo el equipo de los servicios de Dermatología, Inmunología, Anatomía Patológica, Reumatología y Endocrinología del Hospital Universitario de La Princesa.

A mis padres y mi hermano, por ser la razón de todo.

A Verónica, por ser la respuesta a todo.

ÍNDICE

1. Presentación.

2. Resumen.

3. Introducción.

3.1. Histopatología de la psoriasis.

3.2. Inmunopatogenia de la psoriasis.

3.2.1. Queratinocitos e inmunidad cutánea.

3.2.2. Células dendríticas.

3.2.3. Macrófagos y neutrófilos.

3.2.4. Células T.

3.2.5 Citoquinas.

3.3. Epigenética. MicroARNs en psoriasis.

3.3.1. Introducción.

3.3.2. Origen de los microARNs.

3.3.3. Función inmunológica de los microARNs en la psoriasis.

3.3.4. Los microARNs como potenciales biomarcadores en psoriasis.

3.4. Terapias biológicas actuales en psoriasis.

4. Objetivos generales del estudio.

5. Estudio 1: Expresión de microARNs en piel psoriásica y su asociación con mejoría de la enfermedad.

5.1. Objetivos específicos.

5.2. Material y Métodos.

5.2.1. Población del estudio y recogida de muestras.

5.2.2. Técnica de secuenciación masiva (NGS) para la detección de microARNs diferencialmente expresados en biopsias de piel.

5.2.3. Aislamiento de ARN y retro-transcripción.

5.2.4. Validación mediante RT-PCR de los microARNs diferencialmente expresados.

5.2.5. Identificación de genes diana de los microARNs.

5.2.6. Estudio estadístico.

5.3. Resultados.

5.3.1. Identificación de microARNs diferencialmente expresados en piel psoriásica.

5.3.2. Efecto de las variables demográficas y clínicas en la expresión de microARNs.

5.3.3. Expresión diferencial de microARNs y su modificación después del tratamiento.

5.3.4. Correlación entre la expresión de microARNs y variables clínicas/actividad de la psoriasis.

5.3.5. Expresión basal de miR-146a y miR-135b y su asociación con la mejoría en la actividad de la enfermedad.

5.3.6. Asociación entre los genes diana de los microARNs y la psoriasis.

6. Estudio 2: Perfiles de microARNs en suero para evaluar el riesgo potencial y la gravedad de la psoriasis y otras

enfermedades inflamatorias mediadas por la respuesta inmune (IMIDs).

6.1. Objetivos específicos.

6.2. Material y Métodos.

6.2.1. Pacientes y recogida de muestras.

6.2.2. Extracción de ARN y RT-PCR.

6.2.3. Análisis de la RT-PCR.

6.2.4. Análisis estadístico.

6.3. Resultados.

6.3.1. Características clínicas de los pacientes con IMIDs.

6.3.2. Expresión de microARNs en pacientes con IMIDs.

6.3.3. Expresión de microARNs en pacientes con psoriasis.

7. Discusión.

7.1. MicroARNs en piel psoriásica.

7.2. MicroARNs en suero de pacientes con psoriasis u otras IMIDs.

8. Conclusiones.

9. Bibliografía.

10. Anexos.

10.1. Índice de acrónimos.

10.2. Pies de figuras y tablas.

10.3. Consentimientos informados.

10.4. Publicaciones asociadas.

10.5. Material suplementario.

10.6. Financiación.

1. Presentación.

En los últimos años, se ha realizado un gran esfuerzo investigador para conocer mejor la fisiopatogenia de la psoriasis y poder determinar así una serie de biomarcadores útiles en el diagnóstico de la enfermedad, el pronóstico clínico o de la respuesta a distintas herramientas terapéuticas e, incluso, en el establecimiento de nuevas dianas de tratamiento.

En el Hospital Universitario de La Princesa, esta investigación se ha realizado en las últimas décadas encabezada por los Dres. Esteban Daudén Tello, jefe del Servicio de Dermatología, y Francisco Sánchez Madrid, jefe del Servicio de Inmunología. Bajo su liderazgo y con una intensa actividad investigadora protagonizada por las Dras. Hortensia de La Fuente Flores y Mar Llamas Velasco, de los Servicios de Inmunología y Dermatología respectivamente, se han desarrollado distintas líneas de investigación en psoriasis que abarcan, entre otras, desde la profundización en los mecanismos de su fisiopatogenia, a la búsqueda y desarrollo de biomarcadores diagnósticos y pronósticos o las repercusiones inmunológicas asociadas al empleo de determinadas dianas terapéuticas.

Este trabajo se centra en el estudio de los microARNs, pequeñas moléculas de ARN no codificantes que regulan la expresión génica a nivel post-transcripcional. En los últimos años, hay cada vez más

evidencia acumulada implicando a los microARNs en la patogenia de enfermedades dermatológicas como la psoriasis y el eccema atópico. Nuestra línea de investigación se ha centrado en el estudio de estas moléculas como biomarcadores en piel de gravedad y respuesta a tratamiento en pacientes con psoriasis y como biomarcadores en suero de riesgo potencial y gravedad de psoriasis y otras enfermedades inflamatorias mediadas por la respuesta inmune.

Este proyecto recibió, en junio de 2017, el Primer Premio en Proyectos de Investigación Multicéntricos otorgado por la Sección Centro de la Academia Española de Venereología y ha generado diversas comunicaciones en distintas reuniones y congresos científicos entre las que destacan:

- *Expression of miRNAs in psoriasis. Predictor to treatment response?* 24º Congreso Mundial de Dermatología (Milán, 2019).
- *Expression of uncharacterized miRNAs in Psoriasis: miRNA-9-5p, mir-375, and mir-133a-3p.* 27º Congreso de la Academia Europea de Dermatología y Venereología (París, 2018).
- *Detection and characterization of miRNAs in serum and skin samples of patients with psoriasis. Usefulness as biomarkers of severity.* 15º Simposio de Primavera de la Academia Europea de Dermatología y Venereología (Montenegro, 2018).
- *Detección y caracterización de microARNs en suero y piel de pacientes con psoriasis. Utilidad como biomarcadores de gravedad.* 3º Congreso Nacional de Psoriasis (Madrid, 2018).

La línea de investigación principal ha dado lugar a la publicación de dos artículos originales, el segundo de ellos fruto de la colaboración con los Servicios de Endocrinología y Reumatología del Hospital Universitario de La Princesa:

- **Chicharro P**, Rodríguez-Jiménez P, Llamas-Velasco M, Montes N, Sanz-García A, Cibrian D, Vara A, Gómez MJ, Jiménez-Fernández M, Martínez-Fleta P, Sánchez-García I, Lozano-Prieto M, Triviño JC, Miñambres R, Sánchez-Madrid F, de la Fuente H, Daudén E. Expression of miR-135b in psoriatic skin and its association with disease improvement. **Cells**. **2020**;9:E1603. (Factor de Impacto: 5,276).
- Martínez-Hernández R, de la Fuente H, Lamana A, Sampedro-Núñez M, Ramos-Levi A, Serrano-Somavilla A, García-Vicuña R, Ortiz AM, Daudén E, Llamas-Velasco M, **Chicharro P**, Rodríguez-Jiménez P, Sanz-García A, Sánchez-Madrid F, González-Álvaro I, Marazuela M. Utility of Circulating Serum miRNA Profiles to Evaluate the Potential Risk and Severity of Immune-Mediated Inflammatory Disorders. **J Autoimmun**. **2020**;111:E102472. (Factor de Impacto: 6,658).

De igual forma, durante mi tesis doctoral y en líneas paralelas de investigación en psoriasis he participado en diversos proyectos que han dado lugar a las siguientes publicaciones:

- **Chicharro P**, Rodríguez-Jiménez P, De la Fuente H, Fraga-Fernández J, Cibrian D, Sánchez-Madrid F, Daudén E. Mixed profile of cytokines in paradoxical eczematous eruptions associated with anti-IL-17 therapy. **J Allergy Clin Immunol Pract.** **2020**;18:E30708.
- **Chicharro P**, Sánchez-Moya A, Rodríguez-Jiménez P, Llamas-Velasco M, Daudén E. Tuberculosis re-screening in psoriatic patients under continuous biological therapy. Does the treatment modify the tuberculin skin test response? **J Eur Acad Dermatol Venereol.** **2019**;33:e295-e296.
- Rodríguez-Jiménez P, **Chicharro P**, Llamas-Velasco M, Cibrian D, Trigo-Torres L, Vara A, Jiménez-Fernández M, Sevilla-Montero J, Calzada MJ, Sánchez-Madrid F, de la Fuente H, Daudén E. Thrombospondin-1/CD47 Interaction Regulates Th17 and Treg Differentiation in Psoriasis. **Front Immunol.** **2019**;10:1268.
- Herrero-Moyano M, Pedraz J, Muñoz-Aceituno E, **Chicharro P**, Reolid A, Lara S, Daudén E. Trough (C0) and 2 hour post-dose (C2) cyclosporine monitoring in patients with moderate-to-severe psoriasis". **J Eur Acad Dermatol Venereol.** **2019**;33:e215-e217.

- **Chicharro P**, García-Río I, Rodríguez-Jiménez P, Pérez-Plaza A, Pérez-Gala S, Marrón C, et al. Prevalence of amyloid deposits determined by fine-needle aspiration of abdominal fat in patients with psoriasis. **J Eur Acad Dermatol Venereol. 2017**;31:e280-e281.
- Rodríguez-Jiménez P, **Chicharro P**, Godoy A, Llamas-Velasco M, García M, Daudén E. No evidence for induction of autoantibodies or autoimmunity during treatment of psoriasis with ustekinumab. **Br J Dermatol. 2017**;177:862-863.

Actualmente, sigue en desarrollo la investigación con microARNs en suero de pacientes con psoriasis como biomarcadores de respuesta a tratamiento que, esperamos, pueda significar un punto de inflexión en las decisiones terapéuticas individualizadas para estos pacientes.

2. Resumen.

Los microARNs se han relacionado con la psoriasis desde hace poco más de una década. Sin embargo, estamos lejos de una comprensión completa de su papel durante el desarrollo de esta enfermedad, al igual que ocurre con otras enfermedades inflamatorias mediadas por la respuesta inmune (IMIDs). La posibilidad de que determinados perfiles de microARNs, ya sea en piel o circulantes, puedan utilizarse como biomarcadores de riesgo de desarrollo, de gravedad o de respuesta a tratamiento ha alimentado el interés creciente en estas moléculas.

Nuestro objetivo en este trabajo fue, en primer lugar, el de caracterizar la expresión cutánea de microARNs no descritos previamente en psoriasis, los cambios inducidos en esta expresión tras el tratamiento con biológicos y su asociación con la mejoría de la enfermedad. Para ello, en una primera fase realizamos técnicas de secuenciación masiva (NGS) a partir de cinco muestras de piel de pacientes con psoriasis (piel lesional y no lesional) y cinco controles. Posteriormente, de esta cohorte se seleccionaron 12 microARNs para ser validados y analizados en muestras de piel de 44 pacientes con psoriasis en placas. En 15 de estos pacientes se obtuvo una muestra adicional después de tres meses de tratamiento biológico. El análisis de los resultados mostró una disminución de la expresión de miR-9-5p, miR-133a-3p y miR-375 en piel lesional de los pacientes con psoriasis. Después del

tratamiento, la expresión de miR-133a-3p, miR-375, miR-378a y miR-135b en las lesiones residuales retornó a los niveles observados en la piel no lesional. Por otro lado, la disminución de los niveles de expresión de miR-135b después del tratamiento con terapias biológicas se asoció, tanto con la mejoría de los pacientes evaluada mediante la escala del índice de gravedad y área de psoriasis (PASI), como con la disminución de la respuesta inflamatoria local. Además, la expresión basal de miR-135b junto con la edad se asoció con la mejora de la psoriasis, lo que sugiere su posible utilidad como biomarcador pronóstico.

En una segunda parte del trabajo, el objetivo fue el de caracterizar la expresión de distintas firmas de microARNs circulantes en suero que se pudieran emplear como biomarcadores predictivos de desarrollo y de gravedad. En esta segunda fase, se realizó un trabajo multidisciplinar, incluyendo en el estudio no sólo pacientes con psoriasis, sino con otras IMIDs: enfermedad de Graves (EG) y artritis reumatoide (AR). Se incluyeron un total de 78 sujetos: 20 sujetos control, 20 pacientes con psoriasis, 19 pacientes con EG y 19 pacientes con AR. Mediante ensayos de reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) se estudió la expresión en suero de un panel de microARNs asociados a la respuesta inmune. Se analizaron las diferencias entre las distintas enfermedades y, en su caso, según la gravedad de éstas. Nuestros resultados mostraron que los niveles circulantes de miR-19b y miR-26b disminuyeron significativamente

($p < 0,001$) en pacientes con IMIDs en comparación con los sujetos control. Además, el análisis de las curvas ROC (*Receiver Operating Characteristic*) mostró que estos microARNs eran discriminadores adecuados capaces de identificar la presencia de una IMID, con áreas bajo la curva (AUC) de 0,85 y 0,83, respectivamente. Asimismo, establecimos que, tanto el miR-19a, como el miR-143, aumentaron significativamente en pacientes con IMIDs con enfermedad grave ($p < 0,05$). En resumen, nuestros hallazgos identificaron dos firmas de microARNs diferentes. Una de ellas está asociada a la presencia de psoriasis u otras IMIDs y podría conducir al desarrollo de herramientas para su detección temprana. La segunda firma es capaz de discriminar entre formas leves y graves de estos trastornos y podría ser una herramienta para seleccionar pacientes candidatos a un tratamiento más intenso de forma precoz.

3. Introducción.

La psoriasis es una enfermedad crónica de la piel, inmunomediada, que afecta aproximadamente a 125 millones de personas en todo el mundo. La psoriasis en placas es la variante más común, que representa más del 80% de los casos de psoriasis. Se caracteriza por placas o parches escamosos eritematosos que ocurren comúnmente en superficies extensoras, pero también pueden afectar a zonas intertriginosas, palmas, plantas y uñas (Figura 1). Otras variantes morfológicas de la psoriasis incluyen la psoriasis en gotas, eritrodérmica y pustulosa. La psoriasis afecta por igual a hombres y mujeres, y afecta a los adultos más que a los niños. Aproximadamente un tercio de los pacientes con psoriasis desarrollarán una artritis psoriásica en algún momento de su evolución. Además, los pacientes con psoriasis grave o inicio temprano de la enfermedad tienen más riesgo de presentar comorbilidades de perfil cardiovascular. Los factores genéticos juegan un papel crítico en el desarrollo de la psoriasis, mientras que los factores ambientales pueden exacerbarla. Los avances recientes más relevantes respecto a la psoriasis se han producido en su patogenia, genética, comorbilidades y en el desarrollo de tratamientos biológicos. [Mease et al., 2005; Michalek et al., 2017; Paller et al., 2018; Armstrong et al., 2020].



Figura 1: Manifestaciones clínicas de la psoriasis. (a, b, c y d) Psoriasis en placas. (e) Psoriasis con afectación del cuero cabelludo. (f) Artritis psoriásica. (g y h) Onicopatía psoriásica. (i) Psoriasis invertida con afectación de área intertriginosa inguinal. (j y k) Psoriasis pustulosa generalizada. (l) Psoriasis pustulosa palmar. (m) Acrodermatitis continua de Hallopeau. [Boehncke et al., 2015].

3.1. Histopatología de la psoriasis.

El sello distintivo de la psoriasis sería una inflamación sostenida que conduce a una proliferación sin control de queratinocitos, con una diferenciación disfuncional. No obstante, la psoriasis muestra cambios histopatológicos característicos en casi todos los tipos de células cutáneas. A diferencia de la piel normal, las características distintivas de la psoriasis incluyen acantosis epidérmica, hiperqueratosis y paraqueratosis. Las crestas epidérmicas están marcadamente alargadas. En la dermis, los vasos sanguíneos dilatados y contorsionados llegan hasta los extremos de las papilas dérmicas. Estos cambios asocian un infiltrado inflamatorio que contiene células T, notable dentro de la dermis y la epidermis, así como un mayor número de macrófagos, mastocitos y neutrófilos. Los neutrófilos se acumulan dentro de la epidermis formando las llamadas pústulas de Kogoj o microabscesos subcorneales, también denominados microabscesos de Munro (Figura 2) [Nestle et al., 2009; Boehncke et al., 2015].

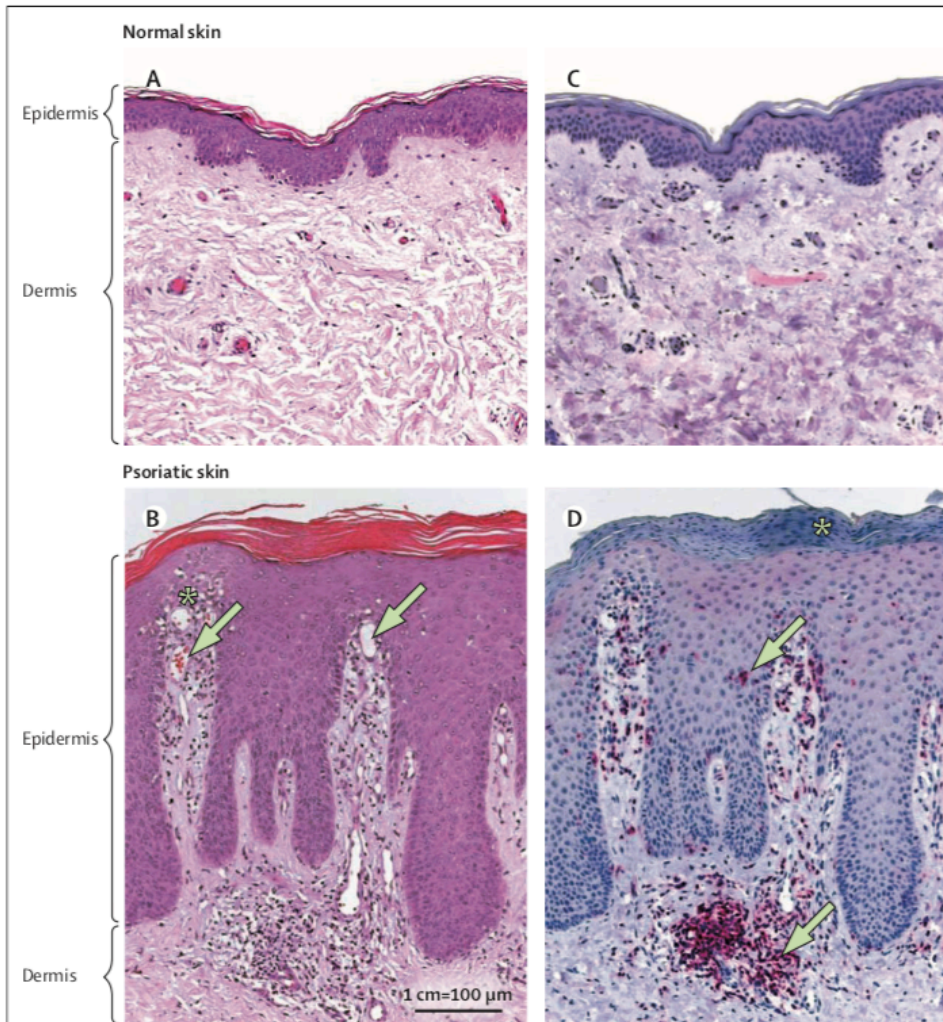


Figura 2: Características histopatológicas de la psoriasis. Dentro de la placa típica, la epidermis psoriásica muestra acantosis epidérmica marcada, hiperqueratosis y elongación de las crestas (a) Piel normal y (b) piel psoriásica lesional, teñidas con hematoxilina y eosina. Los vasos sanguíneos dérmicos dilatados y contorsionados llegan hasta las puntas de las papilas dérmicas (b, flechas). Se observa un infiltrado

inflamatorio mixto con acumulación de neutrófilos dentro de la epidermis (b, asterisco). A diferencia con la piel normal (c), la detección inmunohistoquímica de CD3 revela diversas células T en la dermis y la epidermis de la piel psoriásica lesional (d, flechas). Los núcleos celulares presentes en la capa córnea de la epidermis también son característicos de la piel psoriásica lesional (d, asterisco). [Boehncke et al., 2015].

3.2. Inmunopatogenia de la psoriasis.

La patogenia de la psoriasis es altamente compleja y todavía no está completamente definida. La evidencia científica acumulada respalda el papel protagonista de una alteración en la regulación del sistema inmunológico. Esta evidencia incluye, entre otras, la aparición de células T clonales en lesiones persistentes, los casos acumulados descritos de curación de la psoriasis en pacientes que se han sometido a un trasplante de médula ósea o el papel de las células T y las citoquinas en modelos animales de psoriasis. Así mismo, la eficacia terapéutica de los distintos fármacos que regulan la respuesta inmune evidencia el papel central de los linfocitos T y las citoquinas proinflamatorias en la inmunopatogenia de esta enfermedad. Por lo tanto, las lesiones psoriásicas probablemente evolucionan como una interacción entre las células y los mediadores del sistema inmunológico, específicamente por sus funciones innata y adaptativa,

y el epitelio de la piel y el tejido conectivo (Figura 3) [Griffiths et al., 1986; Eedy et al., 1990; Gardembas-Pain et al., 1990; Prinz et al., 1991; Menssen et al., 1995; Schön et al., 2005; Nestle et al., 2009; Boehncke et al., 2015].

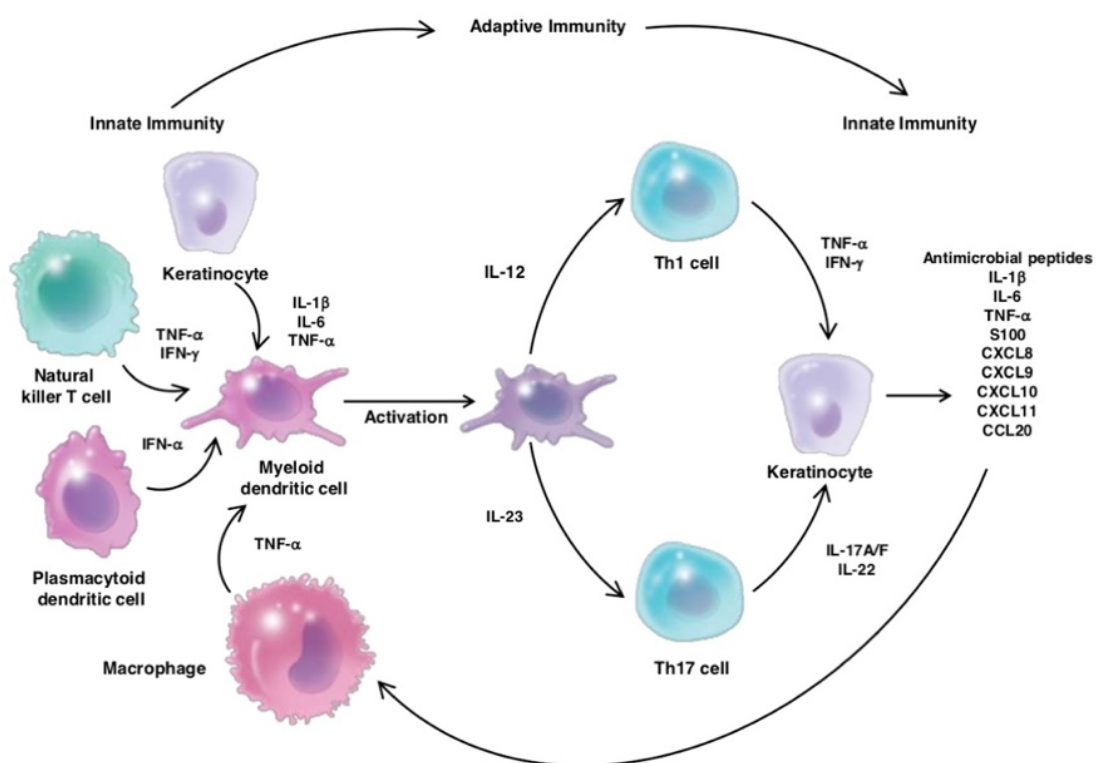


Figura 3: Células clave y mediadores en la transición de la inmunidad innata a la adaptativa en la psoriasis. Las células inmunitarias innatas producen citoquinas clave [factor de necrosis tumoral α ($TNF-\alpha$), interferón- α ($IFN-\alpha$), interferón- γ ($IFN-\gamma$), interleuquina (IL)- 1β e $IL-6$] que activan las células dendríticas mieloides. Las células dendríticas

activadas presentan antígenos y secretan mediadores como la IL-12 y la IL-23, lo que conduce a la diferenciación de las células T cooperadoras tipo 1 y tipo 17 (Th1 y Th17). Las células T, a su vez, secretan mediadores (por ejemplo, IL-17A, IL-17F e IL-22) que activan los queratinocitos e inducen la producción de péptidos antimicrobianos (por ejemplo, catelicidina LL-37 y defensinas β), citoquinas pro-inflamatorias (TNF- α , IL-1 β e IL-6), quimioquinas (CXCL8 a CXCL11 y CCL20) y proteínas S100. Estos mediadores solubles retroalimentan el ciclo de la enfermedad pro-inflamatoria y dan forma al infiltrado inflamatorio [Adaptado de Nestle et al., 2009].

El desarrollo en los últimos años de distintas terapias biológicas dirigidas contra dianas específicas integrantes de esta cascada inflamatoria ha impulsado el conocimiento más profundo de la inmunopatogenia de la psoriasis. Aunque en el apartado 3.4 se exponen las distintas terapias biológicas disponibles actualmente y sus características, en la Figura 4 se resume el modelo fisiopatológico actual en psoriasis de activación de la cascada inflamatoria y sus efectos, así como las dianas de actuación de estos tratamientos.

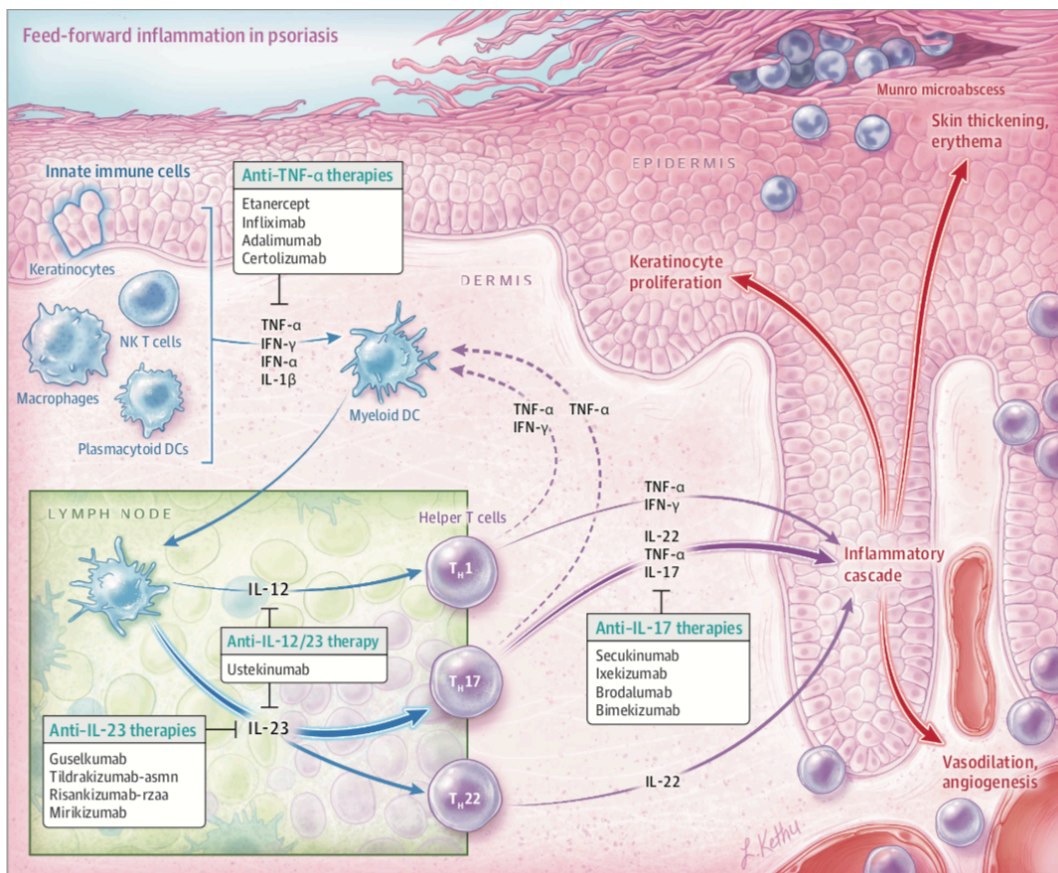


Figura 4: Fisiopatología de la psoriasis y dianas específicas de terapias biológicas. La fisiopatología de la psoriasis implica una activación excesiva de retroalimentación del sistema inmunológico adaptativo. Las células dendríticas mieloides activadas secretan un exceso de interleuquina (IL)-12 e IL-23. IL-12 induce la diferenciación de células T naïve a células T cooperadoras de tipo 1 (Th1). IL-23 es fundamental para la supervivencia y proliferación de las células Th17 y Th22. Las células Th17 (y otras células inflamatorias) secretan IL-17. Las células Th1 secretan factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y las

células TH22 secretan IL-22. Estas citoquinas secretadas activan la transducción de señales intracelulares en los queratinocitos para provocar la transcripción génica de citoquinas y quimioquinas. Esto da como resultado una cascada inflamatoria que conduce a las manifestaciones de la enfermedad psoriásica. DC: célula dendrítica; IFN: interferón; NK: célula natural killer [Armstrong et al., 2020].

3.2.1. Queratinocitos e inmunidad cutánea.

Actualmente se acepta la propuesta de que existe un sistema inmunológico residente en la piel. Publicaciones recientes han demostrado que los queratinocitos contribuyen sustancialmente a la inmunidad de la piel e interactúan con otras células inmunes para expandir la respuesta inflamatoria. Los queratinocitos pueden servir como células presentadoras de antígeno (CPA) no específicas a través de la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase II. Los queratinocitos expresan también moléculas como CD40, lo que permite su interacción con las células que expresan CD40L; en relación con este punto, se ha demostrado que la sobreexpresión del ligando CD40 en los queratinocitos da como resultado el desarrollo de una enfermedad cutánea inflamatoria crónica en ratones. También se ha demostrado que los queratinocitos promueven la infiltración de células T en la dermis mediante la expresión de E-Cadherina que interactúa con la

integrina $\alpha_E\beta_7$ expresada en las células T de memoria. Además, los queratinocitos pueden producir una variedad de quimioquinas y citoquinas pro-inflamatorias que incluyen CXCL8, CXCL20, interleuquina (IL)-1, IL-23, IL-17 e interferón gamma (IFN- γ), que inducen el reclutamiento y la activación de más células, incluidos los neutrófilos y las propias células T [Conrad et al., 2007; Sweeney et al., 2011].

Los queratinocitos también contribuyen a la vigilancia inmunitaria a través de la expresión de una variedad de receptores tipo toll (TLR): TLR1-6 y TLR9. En los queratinocitos, la luz ultravioleta activa el inflamasoma NLRP3, un miembro de la familia del dominio de oligomerización de nucleótidos que funciona como un receptor de reconocimiento de patrones/antígenos (PRR) intracelular. La activación de NLRP-3 da como resultado la conversión de pro-IL-1b en IL-1b madura [Baker et al., 2003; Begon et al., 2007; Feldmeyer et al., 2007; Keller et al., 2008; Wang et al., 2011].

Si bien los queratinocitos pueden tener efectos profundos sobre la inmunidad de la piel, está claro que otros componentes del sistema inmunológico pueden, a su vez, influir en las acciones de los queratinocitos. La IL-23 induce la producción de IL-22 que promueve la hiperproliferación de queratinocitos, mientras que la IL-15 puede inhibir la apoptosis de los queratinocitos, estando ambas aumentadas en la piel psoriásica. Se ha demostrado que el IFN- γ induce la expresión de CD40, mientras que la señalización de TLR3 induce la expresión de

TLR7 en los queratinocitos. Se ha descrito que el bloqueo del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) conduce a una restauración de la diferenciación de queratinocitos acompañada de una reducción en el número de células T, macrófagos y células dendríticas (DC) en las placas psoriásicas. Podemos, por tanto, concluir que existe una gran interacción entre los queratinocitos y otras células inmunitarias en la psoriasis (Figura 5) [Ruckert et al., 2000; Marble et al., 2007; Zheng et al., 2007; Kalali et al., 2008].

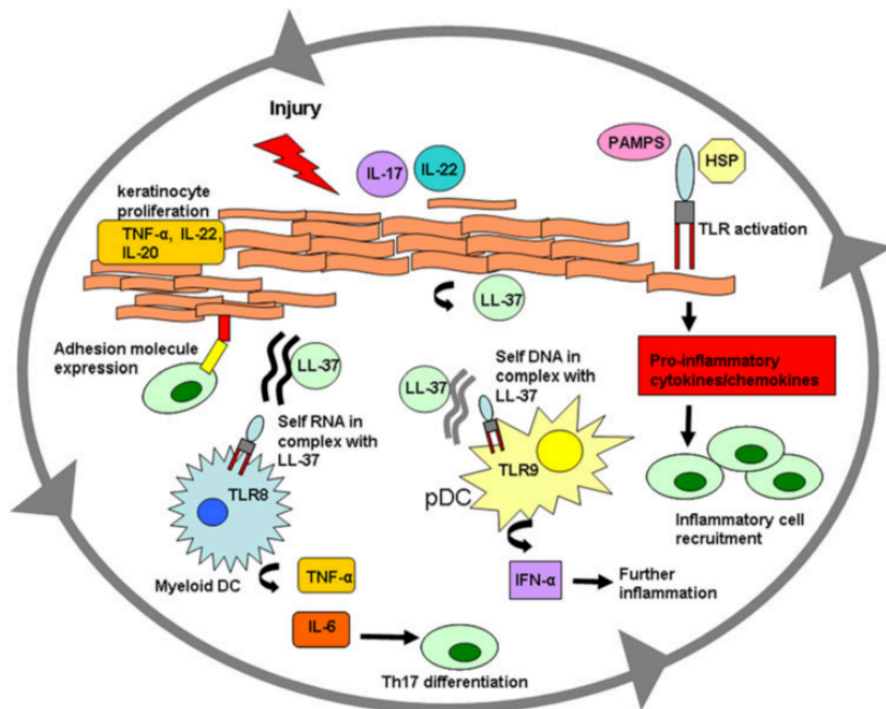


Figura 5: Interacción entre queratinocitos y mediadores inmunitarios.

La interacción entre los queratinocitos y los mediadores inmunitarios contribuye a la formación de un bucle inflamatorio que se perpetúa a

sí mismo. Un desencadenante desconocido conduce a la formación de la placa inflamatoria caracterizada por la infiltración de células inflamatorias y la proliferación de queratinocitos. El daño tisular local y las citoquinas pro-inflamatorias: interleuquina (IL)-17 e IL-22 inducen la producción del péptido antimicrobiano LL-37, a partir de queratinocitos que, en conjunto con los ácidos nucleicos liberados de los queratinocitos durante la muerte celular, desencadenan la activación del receptor Toll-like (TLR) 8 y TLR9 en células dendríticas (DC) mieloides y plasmocitoides (pDC) respectivamente. Las DC mieloides activadas contribuyen a la inflamación psoriásica a través de la producción de IL-6 y el factor de necrosis tumoral (TNF)- α . IL-6 induce el desarrollo de células T cooperadoras (Th17) que conducen a la producción de IL-17 adicional, mientras que TNF- α induce la maduración de células presentadoras de antígeno e induce una mayor proliferación de queratinocitos. TNF- α también induce la producción de IL-8 que conduce al reclutamiento de neutrófilos que expresan IL-17. La activación de DC plasmocitoides da como resultado la producción de interferón (IFN)- α , que contribuye a la patogénesis de la enfermedad. HSP: proteínas de shock térmico. PAMP: patrón molecular asociado a patógeno [Sweeney et al., 2011].

3.2.2. Células dendríticas (DC).

Las DC son células centinela clave del sistema inmunológico, estableciendo un puente entre la inmunidad innata y la adaptativa. Se derivan de células madre hematopoyéticas y se pueden dividir en varios subtipos en función de la expresión de antígeno de superficie, función y ubicación. Las DC humanas pueden clasificarse como CD11c^{hi} o mieloides (DCm), CD11c^{low} o plasmocitoides (DCp) y población CD34⁺ de DC. Se han identificado varios subconjuntos de DC en órganos linfoides y en órganos no linfoides, incluidos la sangre y la piel. Los monocitos humanos son precursores de DC y las DC derivadas de monocito (MDDC) se generan cultivando monocitos con factores de crecimiento de DC. Las DCm y las DCp se cultivan utilizando células madre hematopoyéticas CD34⁺ de sangre de cordón. Alternativamente, las DC puede aislarse directamente de la sangre o la piel. Todos los subconjuntos de DC expresan HLA-DR, funcionan como CPA y son altamente eficaces al activar células T *naïve*. Las DC detectan la presencia de organismos infecciosos a través de la expresión de una amplia gama de PRR, pero también detectan la presencia de mediadores inflamatorios que incluyen citoquinas y HSP producidas durante la inflamación. Al detectar patógenos invasores, las DC se someten a un proceso conocido como maduración. Las DC inmaduras son muy fagocíticas pero expresan niveles muy bajos del MHC de clase II y moléculas coestimuladoras. Tras su activación, las DC migran al ganglio linfático y maduran. Las DC maduras expresan niveles elevados

de MHC de clase II y moléculas coestimuladoras CD80, CD86 y CD40, y son muy eficaces para activar células T *naïve*. Las DC juegan un papel central en la dirección de la respuesta inmune adaptativa mediante la producción de citoquinas que influyen en la diferenciación de los linfocitos Th. Se ha sugerido que las DC pueden desempeñar un papel patógeno en la autoinmunidad mediante la producción de citoquinas pro-inflamatorias y la activación de células T específicas de autoantígeno [Steinman et al., 2002; Kapsenberg et al., 2003; Pulendran et al., 2004; Sousa et al., 2006].

La presencia de DCm en piel psoriásica está aumentada hasta 30 veces y se ha confirmado que inducen el desarrollo de células Th que coexpresan IL-17 e IFN- γ . Por tanto, es posible que las DCm contribuyan a la patogénesis de la psoriasis al producir factores como TNF- α y óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), promoviendo así el desarrollo de subconjuntos de células Th patogénicas [Lowes et al., 2005; Zaba et al., 2009; Sweeney et al., 2011].

Las DCp constituyen el 0,2-0,8% de las células mononucleares de sangre periférica circulantes. Expresan exclusivamente BDCA-2, una glicoproteína transmembrana e ITL7, un miembro de la familia de transcripción *immunoglobulina-like*. Las DCp contribuyen a la inmunidad antiviral al producir grandes cantidades de IFN de tipo I, específicamente IFN- α . Se ha demostrado que el IFN- α desempeña un papel patogénico en la psoriasis. El tratamiento de pacientes con psoriasis con IFN- α exacerba la enfermedad y los ratones que carecen

del factor regulador de interferón (IRF)-2, que atenúa la señalización del INF tipo I, desarrollan unas lesiones cutáneas inflamatorias similares a la psoriasis. La cantidad de DCp activadas está aumentada en la piel psoriásica en comparación con la piel normal. Además, el trasplante de piel psoriásica no lesional induce la aparición de psoriasis en ratones inmunodeficientes. El tratamiento con anticuerpo anti-BDCA-2 suprimió la producción de IFN- α por DCp e inhibió el desarrollo de psoriasis en ratones injertados con piel psoriásica, indicando de nuevo un papel fundamental del IFN- α y las DCp en el desarrollo de la enfermedad [Siegal et al., 1999; Hida et al., 2000; Dzionek et al., 2001; Liu et al., 2005; Nestle et al., 2005; Sweeney et al., 2011].

3.2.3. Macrófagos y neutrófilos.

Los macrófagos son células derivadas de la médula ósea que contribuyen a la respuesta inmunitaria a través de la fagocitosis de patógenos y la producción de mediadores inflamatorios. Los macrófagos expresan CD14, CD68, HLR-DR, CD11c y RM3/1, y sirven como CPA para estimular la proliferación de células T. Los macrófagos dérmicos expresan el receptor captador CD163 y el factor XIIIa, un componente de la cascada de la coagulación. La evidencia acumulada sugiere que los macrófagos juegan un papel clave en la patogénesis de la psoriasis. Los macrófagos se acumulan en la piel lesional y producen una variedad de citoquinas y quimioquinas que incluyen IL-1b, IL-6,

IFN- γ , iNOS y proteína quimiotáctica de monocitos (MCP)-1 [Djemadji-Oudjil et al., 1996; Willment et al., 2003; Marble et al., 2007; Zaba et al., 2007].

Los macrófagos son la fuente principal de TNF- α . Se ha comprobado que un mayor número de macrófagos productores de TNF- α e iNOS se acumulan en la piel lesional de ratones transgénicos con enfermedad similar a la psoriasis. En estos ratones, la neutralización del TNF- α atenuó los síntomas de la enfermedad acompañada de una disminución significativa del número de macrófagos. La reducción de los macrófagos mejoró la inflamación en dos modelos diferentes de psoriasis, lo que sugiere un papel central de estas células en la enfermedad [Stratis et al., 2006; Wang et al., 2006; Wang et al., 2009].

Los neutrófilos participan en la fagocitosis, pero también sirven como CPA no específicos a través de su expresión de MHC de clase I y II. Los neutrófilos se acumulan en lesiones psoriásicas en los microabscesos de Munro y producen una variedad de citoquinas pro-inflamatorias que incluyen IL-1, IL-6, IL-8 y TNF- α . La producción por neutrófilos de IL-17 contribuye sustancialmente a la cantidad total de IL-17 en las placas de psoriasis. Además, los neutrófilos producen péptido antimicrobiano α -defensina. La adherencia endotelial y la migración de neutrófilos aumenta en la psoriasis, lo que sirve para promover la migración de neutrófilos a la piel lesional [Sweeney et al., 2011].

3.2.4. Células T.

Las células T juegan un papel fundamental en la defensa contra diferentes patógenos y tumores. La señalización de células T es un proceso altamente organizado en el reconocimiento de antígenos presentados por CPAs en la piel. La patogenia de la psoriasis implica una interacción crucial entre las células T (CD8+, Th1, células T autorreactivas, Th17 y Th22) y las DC dérmicas. Las citoquinas IL-12 e IL-23 liberadas por las DC promueven las respuestas Th1, Th17 y Th22. Estas células T cooperadoras estimulan la proliferación epidérmica y alteran la diferenciación de los queratinocitos, lo que lleva a una disminución en su apoptosis. El papel de las células T CD4+ en la psoriasis se demostró de manera convincente mediante trasplantes de piel humana a ratones inmunodeficientes seguidos de la inyección de células T CD4+ autólogas de pacientes con psoriasis que dieron lugar al desarrollo de la psoriasis en los ratones. Las células T CD4+ de tipo Th1 que producen altos niveles de IFN- γ y TNF- α son actores también fundamentales en el desarrollo de la psoriasis [Nickoloff et al., 1999; Kastelan et al., 2006; Gaffen et al., 2014; Casciano et al., 2018; Hugh et al., 2018].

Las células T locales cutáneas desempeñan un papel fundamental en la protección local ante las agresiones ambientales contra superficies corporales. Estas células inducen respuestas tisulares antimicrobianas, inflamatorias y citotóxicas. Las células T productoras de IL-17 e IL-22 están incrementadas en lesiones psoriásicas activas y resueltas, lo que

influye en la aparición y el mantenimiento de una placa psoriásica. Parte de la sensibilidad cutánea, incluidas formas de prurito, son transmitidas por fibras sensoriales que expresan los canales catiónicos TRPV1 (canal catiónico potencial del receptor transitorio subfamilia V miembro 1). Estas fibras co-expresan el canal de sodio Nav1.8. Recientemente se ha demostrado que estos receptores interactúan con las células dendríticas dérmicas, regulando así la vía IL-17/IL-23 y, por tanto, controlando las respuestas inmunitarias [Rio-Blanco, et al 2014]. La inflamación de la piel está fuertemente disminuida en ratones con deficiencia del receptor de IL-17, lo que sugiere un papel vital de la IL-17 en la generación de lesiones similares a la psoriasis en estos ratones. Si bien las células Th17 son una fuente principal de IL-17, también se ha descrito que otras células, incluidas las células *natural killer* (NK), las células mieloides, las células T $\gamma\delta$, las células inductoras-like de tejido linfoide y las células T NK invariantes (iNKT), liberan IL-17. El aumento de la expresión en la piel lesional y los niveles séricos más altos de IL-17 son características típicas de la psoriasis. Aunque las células Th17 y otras células productoras de IL-17 protegen la barrera epidérmica contra infecciones bacterianas y fúngicas, cuando se producen en exceso, contribuyen a la inflamación crónica. El empleo exitoso de anticuerpos contra IL-17 y el receptor de IL-17 en pacientes con psoriasis subraya la importancia de las células Th17 y apoyan que la IL-17 actúa como “fuerza impulsora” en el desarrollo y el mantenimiento de la psoriasis. Sin embargo, ante el hallazgo de que la IL-23 derivada de las DC promueve el desarrollo de Th17, se ha

hecho evidente que el eje IL-23/Th17 desempeña también un papel importante en la patogenia de la psoriasis. Por ello, la inhibición de IL-23 es un enfoque alternativo para controlar la producción de IL-17. Otros subgrupos de células T implicadas en la fisiopatología de la psoriasis incluyen células T dérmicas $\gamma\delta$ que son capaces de producir IL-17A independientemente de la estimulación de IL-23 [Nickoloff et al., 1999; Van der Fits et al., 2009; Riol-Blanco et al., 2014; Gaffen et al., 2014; Casciano et al., 2018; Hugh et al., 2018; Benhadou et al., 2019].

En la Figura 6 se resume la interacción entre los principales tipos celulares que participan en la fisiopatogenia de la psoriasis.

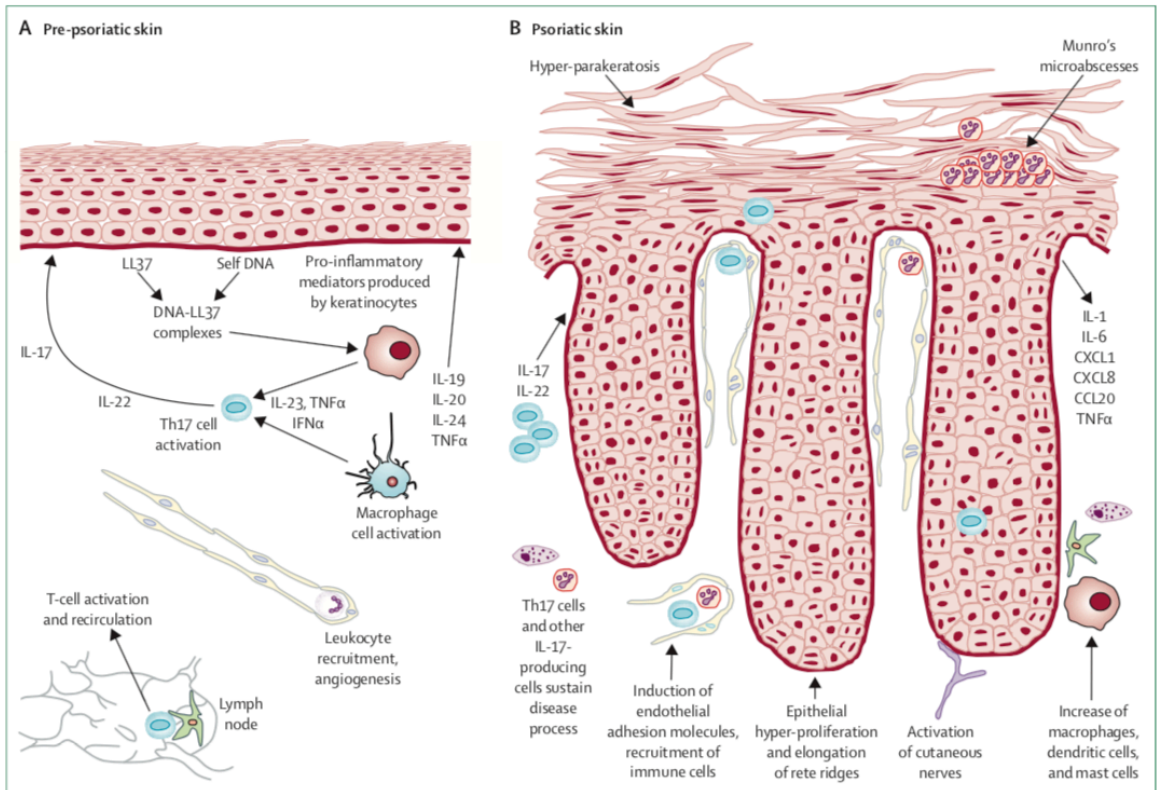


Figura 6: Inmunopatogenia de la psoriasis. Interacciones de poblaciones celulares. La compleja interacción entre los distintos tipos de células cutáneas, que implica a los macrófagos, las células dendríticas, las células T y otras células del sistema inmunológico, involucra a una gran variedad de citoquinas y quimioquinas que orquestan los cambios patológicos en la piel pre-psoriásica. La diferenciación de células T cooperadoras (Th1 y Th17) es estimulada por células dendríticas a través de IL-23. Las células patógenas del sistema inmunitario adaptativo (células T) e innato (macrófagos, mastocitos, granulocitos) producen varios mediadores que inducen y

mantienen las características psoriásicas distintivas tanto en la dermis (por ejemplo, células endoteliales) como en la epidermis (queratinocitos). A su vez, estos últimos tipos celulares facilitan la respuesta inflamatoria a través de sus mediadores. IL: interleuquina; TNF: factor de necrosis tumoral; IFN: interferón [Boehncke et al., 2015].

3.2.5. Citoquinas.

Las citoquinas Th1: IFN- γ e IL-2, así como las citoquinas Th17: IL-17A, IL-17F, IL-22, IL-26 y TNF- α (citoquina Th1 y Th17) están aumentadas en el suero y la piel lesional de los pacientes con psoriasis. La IL-22 producida por Th17 y Th22 también aumenta en las lesiones psoriásicas y en el suero de estos pacientes. Estas citoquinas conducen a la proliferación de queratinocitos, una mayor expresión de mediadores angiogénicos y moléculas de adhesión endotelial, y a la infiltración de células inmunitarias en la piel lesional.

Cada interleuquina se asocia con un fenómeno específico dentro del desarrollo fisopatogénico de la psoriasis (Tabla 1) [Kagami et al., 2010; Michalak-Estoma et al., 2011].

Citoquinas	Fenómeno fisiopatológico
IL-2	Prurito
IL-17, IL-6, IL-22, IL-23, IL-20, IL-15	Acantosis
IL-23, IL-22, IL-20	Paraqueratosis
IL-23, IL-22, IL-17	Hiperqueratosis
IL-15, IL-20, IL-6	Angiogénesis
IL-17, IL-20, IL-22	Mecanismos de defensa antimicrobiana
IL-17, IL-6, IL-15, IL-20	Quimiotaxis de neutrófilos y monocitos
IL-6, IL-17, IL-23, IL-22, IL-15, IL-20	Inflamación dérmica y epidérmica

Tabla 1: Influencia de las citoquinas sobre los principales fenómenos fisiopatológicos de la psoriasis. IL: interleuquina [Adaptado de Michalak-Estoma et al., 2011].

La diferenciación de células CD4+ *naïve* en diferentes subconjuntos de células T depende de la presencia de unas condiciones y un entorno inmunológico específicos, como se resume en la Figura 7.

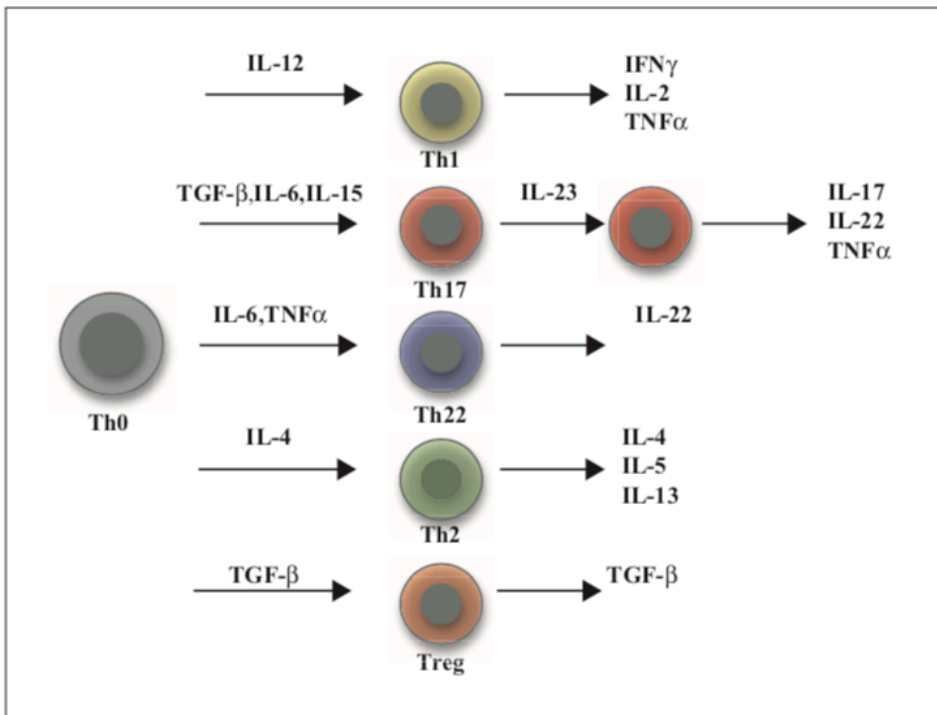


Figura 7: Diferenciación de células T naïve (Th0) en células Th1, Th17, Th22, Th2 y T reguladoras. Se muestran las principales citoquinas implicadas en este proceso. IL: interleuquina; IFN: interferón; TNF: factor de necrosis tumoral; Th: célula T cooperadora; TGF: factor de crecimiento de transformación [Michalak-Estoma et al., 2011].

Interleuquina 2 (IL-2)

La IL-2 es producida por las células T activadas y juega un papel clave en la respuesta antimicrobiana. El receptor de alta afinidad de IL-2 está formado por tres subunidades: IL-2R α (CD25, Tac), IL-2R β (CD122) e IL-2R γ (CD132). Por su parte, el receptor de afinidad intermedia de la IL-2 está formado por las subunidades β y γ . El IL-2R de alta afinidad está presente en células T en proliferación activa, células B recientemente activadas, monocitos y una pequeña población de células NK en reposo, aunque la mayoría de las células NK expresan la isoforma del receptor de afinidad intermedia [Pietrzak et al., 2008].

La interacción IL-2/IL-2R estimula el crecimiento, la diferenciación y la supervivencia de las células T CD8+ seleccionadas por antígenos mediante la activación de la expresión de genes específicos. La IL-2 también es necesaria durante el desarrollo de las células T en el timo para la maduración del subconjunto de células T reguladoras (Treg). Estimula la actividad y proliferación de células NK, monocitos, macrófagos, células madre en la médula ósea, células *killer* activadas por linfoquinas (LAK) y linfocitos infiltrantes de tumores (TIL), así como la diferenciación de células B (junto con IL-15). IL-2 induce además la producción de IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-2R e IL-2 y tiene un papel bien documentado en la inducción del prurito en la dermatitis atópica, la psoriasis y la uremia [Pietrzak et al., 2008; Michalak-Estoma et al., 2011].

Interferon *gamma* (IFN- γ)

El IFN- γ es el único interferón de tipo II, clasificado en este grupo debido a su secuencia de aminoácidos única. Los receptores de IFN- γ se encuentran en la superficie de muchas células, pero su expresión difiere de una célula a otra. La expresión más alta se observa en células T y B, células NK, monocitos, macrófagos, fibroblastos, neutrófilos, células endoteliales y de músculo liso.

El IFN- γ influye en la respuesta inmune regulando la activación, proliferación y diferenciación de células T, células B, macrófagos, células NK, fibroblastos y células endoteliales. IFN- γ estimula la producción de muchos factores pro-inflamatorios como IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, IL-15, TNF, proteína 10 inducida por IFN- γ (IP-10), iNOS, caspasa-1 y gp91^{phox} (NOX2), una subunidad de la NADPH oxidasa. Se ha demostrado que el IFN- γ estimula a las DC para que produzcan IL-1 e IL-23, que son citoquinas promotoras de Th17 y Th22. Recientemente, también se ha demostrado que un subconjunto distinto de células Th17 humanas producen IFN- γ . El IFN- γ aumenta la producción de anticuerpos en respuesta a los antígenos administrados simultáneamente con IFN- α , la expresión de moléculas del MHC clase I y II en las células presentadoras de antígeno (CPA), así como la expresión de ICAM-1 en los queratinocitos y el endotelio [Kryczek et al., 2008; Nograles et al., 2010].

Los datos de la literatura sobre los niveles de IFN- γ en suero y piel lesional y no lesional en pacientes psoriásicos son controvertidos. Sin embargo, diferentes autores han demostrado un nivel elevado de IFN- γ en suero en pacientes psoriásicos y lo han correlacionado con la gravedad clínica de la psoriasis. De hecho, se ha observado una intensa expresión de IFN- γ no sólo en lesiones psoriásicas, sino también en la piel no lesional. Muchos autores afirman que el IFN- γ detectado en piel psoriásica se produce localmente y no proviene de la sangre periférica. [Uyemura et al; 1993; 41; Pietrzak et al., 2008; Michalak-Estoma et al., 2011].

Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α)

Las formas biológicamente activas de TNF- α , tanto de membrana como solubles, son homotrómeros que constan de 3 cadenas de proteínas idénticas. Hay dos tipos de receptores de células TNF- α : TNF-RI (también llamado TNF-R55, TNF-R β , p55, CD120a) y TNF-RII (TNF-R75, TNF-R α , p75, CD120b) que se presentan en todos los tipos de células excepto en los eritrocitos. TNF-RI parece ser responsable de la mayor parte de la actividad de TNF- α . Las formas solubles de ambos receptores, TNF-RI y TNF-RII, se encuentran en sangre. Al unirse al TNF- α , los receptores solubles ejercen un efecto inhibitor o modulador sobre el propio TNF- α [Ware et al., 2004; Schottelius et al., 2004].

El TNF- α es un mediador destacado de la inflamación psoriásica. Parece ser un punto de convergencia para las células Th1 y Th17. Proteínas de la superfamilia TNF influyen en la proliferación, activación y diferenciación de muchas células e incluso estimulan su apoptosis. El TNF- α favorece la síntesis de IL-1, IL-6, GM-CSF, factor inhibidor de leucemia (LIF), el factor de crecimiento de transformación beta (TGF- β), leucotrieno B4 (LTB4), PGE2 y la expresión de algunas moléculas de adhesión (E-selectina, ICAM-1, VCAM-1). El TNF- α induce a las CPA a secretar IL-23 para de esta manera favorecer la respuesta de las células Th17 [Gottlieb et al., 2005; Zaba et al., 2007; Iwamoto et al., 2007].

Se ha observado un nivel elevado de TNF- α en la piel psoriásica lesional en comparación con la piel no lesional y de controles sanos. El TNF- α se localiza en la epidermis y alrededor de los vasos sanguíneos en la dermis superior. Sus fuentes son los queratinocitos, las células de Langerhans (LC) epidérmicas y los macrófagos en la dermis papilar. En la mayoría de las publicaciones se ha encontrado un aumento de los niveles plasmáticos de TNF- α en pacientes con psoriasis activa. Se ha demostrado, además, una correlación positiva entre los niveles séricos de TNF- α y los valores en el Índice de Severidad y Área de Psoriasis (PASI). En la piel de controles sanos y la piel sin lesiones de los pacientes psoriásicos, el TNF-RI se expresa en los queratinocitos epidérmicos y en las DC dérmicas. En la piel psoriásica lesional, se detectan TNF-RI, TNF-RI soluble y TNF-RII en el estrato córneo paraqueratósico. Además, los niveles plasmáticos de TNF-RI en

pacientes psoriásicos están aumentados significativamente en comparación con los de controles sanos [Mizutani et al., 1997; Michalak-Estoma et al., 2011].

Interleuquina 17 (IL-17A)

IL-17 (IL-17A) es miembro de una familia de citoquinas que comprende IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E (IL-25) e IL-17F. Se sabe muy poco acerca de IL-17B, IL-17C e IL-17D, que son producidas por fuentes que no son células T, mientras que IL-25 e IL-17F comparten muchas características con IL-17A. Las células T que producen IL-17 se reconocen como un tercer subconjunto de células Th: células Th17. También se han descrito otras células productoras de IL-17A, incluidas las células CD8+, las células $\gamma\delta$ -TCR, las DC y las células NK. IL-17F e IL-17A tienen una similitud de secuencia del 50% y pueden formar homodímeros de IL-17A e IL-17F o heterodímeros de IL-17A-IL-17F. El receptor de la IL-17A está formado por IL-17RA y el IL-17RC. IL-17RA y RC interactúan juntos para un efecto máximo. IL-17 e IL-17F tienen una actividad pro-inflamatoria que induce la expresión de citoquinas pro-inflamatorias, factores estimulantes de colonias y quimioquinas de las DC, los neutrófilos, las células T, monocitos/macrófagos y células epiteliales. Las células que producen IL-17 de forma selectiva expresan los receptores de quimioquina: CCR6 y CCR4, mientras que las células que producen tanto IL-17 como IFN- γ expresan CCR6 y CXCR3. IL-17A e IL-17F vinculan también las respuestas inmunes específica y no

específica porque pueden movilizar, reclutar y activar neutrófilos. En los sistemas experimentales de queratinocitos, la IL-17 y la IL-22 actúan juntas para inducir la proliferación y expresión de moléculas inmunes co-estimuladoras, así como de quimioquinas neutrofílicas y monofílicas, moléculas de adhesión celular y factores de transcripción [Asarch et al., 2008; Miossec et al., 2009; Armstrong et al., 2011].

Las células Th17 y las citoquinas que producen se encuentran elevadas en la piel psoriásica. Se han caracterizado células productoras de IL-17 de la dermis de lesiones psoriásicas mediante citometría de flujo; el análisis fenotípico de superficie de estas células mostró un fenotipo predominantemente CD161+. Las DC aisladas de la piel psoriásica pueden aumentar el porcentaje de producción de IL-17A en las células T alogénicas. La IL-17 y la IL-22 pueden actuar de manera cooperativa en la mediación de la inflamación tisular mediante la regulación positiva de la transcripción en queratinocitos de péptidos antimicrobianos: β -defensina humana, S100A7 (psoriasina), S100A8, y S100A9 y la metaloproteinasa 3 de la matriz (MMP-3) [Zelante et al., 2007; Aujla et al., 2007; Matsushita et al., 2008; Michalak-Estoma et al., 2011].

Interleuquina 22 (IL-22)

La IL-22 es un miembro de la familia de las citoquinas IL-10 y es producida principalmente por Th17, Th22 y las células NK de las

mucosas. Este subconjunto de células NK (células NK-22) produce IL-22 en respuesta a IL-23 y puede inhibir la inflamación (a través de la producción de IL-10) y proporcionar protección a las mucosas (a través de la proliferación de células epiteliales). Las células Th22 se han descrito recientemente como células T CD4⁺ inflamatorias que producen IL-22, pero no expresan IL-17A o IFN- γ . Las células Th22 también aumentan en las lesiones psoriásicas [Nogales et al., 2010; Michalak-Estoma et al., 2011].

El receptor de IL-22 (IL-22R) es parte de la familia de receptores de citoquinas de clase 2 y consta de dos subunidades, IL-22R1 e IL-10R2. IL-10R2 se expresa en células inmunitarias (células T, B y NK) e IL-22R1 en una variedad de tejidos: piel, pulmón, intestino delgado, hígado, colon, riñón y páncreas. En los queratinocitos, la expresión de IL-22R1 e IL-10R2 aumenta con IFN- γ . También hay un receptor de IL-22 soluble secretado llamado proteína de unión a IL-22 (IL-22BP), que está codificado por un gen diferente. La afinidad de IL-22 por IL-22BP es aproximadamente cuatro veces mayor que la de IL-22 por IL-22R1. IL-22 aumenta el nivel celular del transductor de señales y activador de la transcripción (STAT)-3 en queratinocitos, lo que sugiere un mecanismo de retroalimentación positiva adicional para los efectos de IL-22.

Muchos efectos de IL-22 pueden ser amplificados por TNF- α , IL-17, IFN- γ o IL-1. La IL-22 promueve los mecanismos de defensa antimicrobianos y protege contra el daño tisular. La IL-22 favorece la

expresión de proteínas de fase aguda: amiloide sérico A (AAS) en el hígado y proteína 1 asociada a pancreatitis (PAP1) en el páncreas.

Se han encontrado niveles elevados de ARNm de IL-22 y de la propia IL-22 tanto en la piel como en la sangre de pacientes psoriásicos en comparación con controles sanos. Los niveles de ARNm de IL-22 fueron más altos en la piel lesional que en los monocitos periféricos. Los niveles de IL-22 en plasma se correlacionan con la gravedad de la psoriasis. Esta citoquina induce la proliferación y migración de queratinocitos, inhibe la diferenciación de queratinocitos al inhibir una variedad de genes, tales como el de la filagrina y la involucrina, y aumenta la expresión de moléculas inflamatorias por los queratinocitos, lo que conduce a un aumento del grosor de la piel *in vitro* e *in vivo*. IL-22 también puede estimular las células epiteliales para que liberen quimioquinas, como IL-8 y favorecer de esta manera el reclutamiento de neutrófilos [Cella et al., 2009; Aujla et al., 2009; Sabat et al., 2011; Gutowska-Owsiak et al., 2011].

Interleuquina 23 (IL-23)

La IL-23 junto con la IL-12 pertenece a la familia de las IL-12 y ambas están relacionadas estructuralmente. IL-12 está formada por las subunidades p40 y p35; IL-23 consta de las subunidades p40 y p19. La IL-23 es expresada por monocitos activados, macrófagos, DC CD11c+, células T, células B, queratinocitos y células endoteliales. La

producción de IL-23 es estimulada por muchos microorganismos y por la activación de receptores implicados en la inmunidad innata, incluido el TLR4. IL-23 ejerce sus actividades biológicas a través de la interacción con un complejo receptor heterodimérico compuesto por IL-12R 1 e IL-23R. IL-23R es exclusivo del complejo del receptor de IL-23 y se expresa principalmente en células T, células NK y, en menor medida, en monocitos y poblaciones de DC. Estudios genómicos a gran escala han identificado a IL-23R como un gen de susceptibilidad a la psoriasis, mientras que no se ha encontrado asociación entre psoriasis e IL-12R β 1, el receptor de señalización de IL-12. La expresión de IL-23R aumenta en las células T de memoria más que en las células *naïve*, lo que sugiere que la activación del receptor de células T (TCR) de las células T *naïve* conduce a un aumento en la expresión de IL-23R, lo que provoca una sensibilización de las células a IL-23. Además, IL-23 aumenta la expresión de su propio receptor en células T *naïve* activadas. La IL-23 es también una citoquina clave para establecer un puente entre la respuesta inmune innata y adaptativa. La interacción de IL-23-IL23R aumenta la proliferación de las células Th17 diferenciadas caracterizadas por la producción de IL-17A y otras citoquinas pro-inflamatorias relacionadas, activa las células NK y regula la producción de anticuerpos. IL-23 también regula las citoquinas pro-inflamatorias relevantes en la inmunidad mediada por células contra patógenos intracelulares [McKenzie et al., 2006; Duvallet et al., 2011].

Aunque tanto IL-12 como IL-23 están presentes en la psoriasis, distintos estudios sugieren que es IL-23 la citoquina realmente crucial en la patogénesis de la psoriasis. La expresión de IL-23 se encuentra elevada en lesiones de psoriasis, como se muestra, por ejemplo, por el aumento de los niveles de ARNm de p40 y p19, algo que no ocurre con p35. En la piel psoriásica lesional, la IL-23 es producida en exceso por las DC dérmicas y los queratinocitos, y es capaz de inducir la liberación de citoquinas Th17 que actúan sobre los queratinocitos que producen más IL-23, así como citoquinas pro-inflamatorias, quimioquinas, miembros de la familia S100 y péptidos antimicrobianos. Ejercen su influencia sobre el sustento y la amplificación de la inflamación crónica en la psoriasis. Se ha demostrado que IL-23 media en la hiperplasia epidérmica, la acantosis y la paraqueratosis a través del TNF- α e IL-20R2. Distintos estudios genéticos han revelado que los polimorfismos de un solo nucleótido en los genes IL12B e IL23R, que codifican las subunidades IL-12 / 23p40 e IL23R, respectivamente, están asociados con un mayor riesgo de susceptibilidad a la psoriasis, lo que hace pensar que la vía IL-23/Th17 juega un papel fundamental en esta enfermedad [Di Meglio et al., 2010; Tonel et al., 2011; Michalak-Estoma et al., 2011].

Interleuquina 20 (IL-20)

La IL-20 se parece a la IL-22 estructuralmente y pertenece a la misma familia de citoquinas. Es producida por los queratinocitos en presencia

de IL-22, TNF- α e IL-17, pero no IFN- γ o la propia IL-20 en sí. Los monocitos estimulados y las DC también son capaces de producir esta citoquina. Hay dos complejos de receptores diferentes para IL-20: IL-22R1/IL-20R2 e IL-20R1/IL-20R2. Así, la cadena IL-22R1 es un componente tanto de la IL-22 como del sistema receptor de IL-20. Los receptores de IL-20 se encuentran exclusivamente en células tisulares no hematopoyéticas. La mayoría de los efectos de IL-20 sobre los queratinocitos están mediados principalmente por el receptor IL-22R1/IL-20R2. Los pacientes con psoriasis presentan niveles aumentados de IL-20 en la piel lesional y en sangre. Los niveles sanguíneos de IL-20 se correlacionan con las puntuaciones en la escala PASI de los pacientes. La IL-20 puede desempeñar un papel importante en la fase efectora tardía de la patogénesis de la psoriasis, en la que inhibe la diferenciación terminal, aumenta la competencia antimicrobiana y la producción de quimioquinas para los neutrófilos en los queratinocitos [Wolk et al., 2008; Wolk et al., 2009].

Interleuquina 15 (IL-15)

IL-15, una citoquina similar a IL-2, es una citoquina pro-inflamatoria. Recluta y activa células T y otras células inflamatorias y puede inducir la producción de TNF- α , IFN- γ e IL-17 en cascada. La IL-15 favorece la respuesta Th17. También tiene una función anti-apoptótica y puede

inducir angiogénesis, reclutamiento de células inmunitarias y activación de queratinocitos.

La IL-15 se expresa en las lesiones cutáneas psoriásicas y también está presente en la membrana sinovial de los pacientes con artritis psoriásica. Tiene una gran influencia en los procesos fisiopatológicos de la piel psoriásica, incluida la angiogénesis, el reclutamiento y activación de neutrófilos y macrófagos, la activación de células T citotóxicas y la acantosis. Cuando se inyectaron anticuerpos anti-IL-15 en ratones inmunodeprimidos con piel psoriásica xeno-injertada, se observó la resolución de las lesiones psoriásicas con una disminución de la hiperqueratosis, la paraqueratosis y la proliferación de células inflamatorias. Los polimorfismos genéticos en el gen IL-15 están relacionados con una susceptibilidad genética a la psoriasis [Villadsen et al., 2003; Kane et al., 2004; Michalak-Estoma et al., 2011].

3.3. Epigenética. MicroARNs en psoriasis.

3.3.1. Introducción.

La búsqueda de una secuencia hereditaria, que vinculara los genes que se han relacionado con la psoriasis, ha impulsado el estudio de los distintos mecanismos que conforman la epigenética de la enfermedad. La definición de epigenética más aceptada actualmente es la del estudio de cambios mitóticamente hereditarios en la expresión génica que no implican alteraciones en la secuencia subyacente del ADN. Tradicionalmente, el estudio de los trastornos humanos se ha centrado en determinar las contribuciones genéticas a la enfermedad y, en algunos casos, también en determinar factores ambientales y relacionados con el género y la edad. Sin embargo, cada vez hay más pruebas que demuestran que los desequilibrios en las redes epigenéticas son elementos causantes de diversas patologías, incluidas enfermedades autoinmunes y patología oncológica. Las características epigenéticas varían con la edad y se ven afectadas por las influencias ambientales, lo que proporciona una explicación plausible del vínculo empírico entre los factores ambientales, el envejecimiento y la aparición de enfermedades. Por tanto, los procesos epigenéticos juegan un papel importante en el control de la expresión génica durante ciclo celular y su desarrollo, así como en respuesta a modificaciones ambientales o biológicas. En comparación con la secuencia de ADN, en gran parte estática, el estado epigenético

del genoma varía dinámicamente según los diferentes tejidos. La identificación de anomalías epigenéticas implicadas en la aparición y progresión de una enfermedad es de gran relevancia para el desarrollo de nuevos enfoques terapéuticos porque, a diferencia de las mutaciones genéticas, las aberraciones epigenéticas son potencialmente reversibles con el uso de agentes farmacológicos [Zhang et al., 2011].

Uno de los objetos a estudio más importantes por la epigenética son los ARN no codificantes (ARNnc). Publicaciones recientes han destacado el papel de los ARNnc en la patogenia de la psoriasis. Clasificados según sus tamaños en ARN largos no codificantes (ARNlnc) y microARNs, están implicados en la regulación de las respuestas inmunitarias en distintos niveles reguladores. Como reguladores de la expresión génica a niveles transcripcional y postranscripcional, los ARNlnc participan en la conservación de las células madre hematopoyéticas, la diferenciación y supervivencia de las células mieloides, así como en la actividad de varias células efectoras en el sistema inmunológico. Los microARNs regulan principalmente las respuestas inmunitarias a nivel de la traducción. Por ejemplo, varios microARNs (el grupo miR-17-92, miR-150, miR-155, miR-181 y miR-223) se expresan abundantemente en las células inmunitarias y participan en la maduración, diferenciación y función de estas células. En particular, se han encontrado alteraciones en la regulación de diversos microARNs en las lesiones cutáneas y en la sangre periférica

de pacientes con psoriasis [Tsitsiou et al., 2009; Fen et al., 2017; Zhang et al., 2018; Hadjicharalambous et al., 2019; Yan et al., 2019; Ghafouri-Fard et al., 2020].

Esta tesis doctoral centra su estudio en aspectos específicos de la actividad de los microARNs en relación con la psoriasis. Por ello, a continuación, vamos a desarrollar más en profundidad las características de estas moléculas y su asociación con la enfermedad psoriásica.

3.3.2. Origen de los microARNs.

Los microARNs representan una clase abundante de moléculas pequeñas de ARN, conservadas evolutivamente y no codificantes, que regulan de manera postranscripcional la expresión génica. Estos ARN no codificantes son fundamentales para la vida humana y los estados de enfermedad. Progresivamente aumentan los estudios confirmando el papel relevante de los microARNs en la patogenia de los trastornos inflamatorios de la piel. Sin embargo, la investigación sobre los microARNs en dermatología y psoriasis es todavía relativamente nueva [Hawkes et al., 2016].

Descubiertos por primera vez en el nematodo *Caenorhabditis elegans*, los microARNs son ARN no codificantes pequeños (aproximadamente 22 nucleótidos) derivados de transcripciones de ARN primarias más grandes en el genoma humano. Los genes de microARNs individuales

son transcritos por la polimerasa II o III en forme de microARN primario (pri-miARN) y posteriormente son procesados por las enzimas Drosha (RNASEN) y DGCR8 (región crítica del síndrome de DiGeorge) para dar lugar a un microARN precursor (pre-miARN). El pre-miARN es exportado al citoplasma por XPO5 (Exportin 5) para su procesamiento final por Dicer y su carga en el complejo de silenciamiento. El complejo de silenciamiento con el microARN ya cargado es guiado posteriormente a la región no traducida 3' de los genes de ARNm diana donde se une y altera la traducción o desencadena la degradación del ARNm (Figura 8) [Matranga et al., 2005; Leuschner et al., 2006; Hawkes et al., 2016].

Desde su descubrimiento, se ha informado de más de 2.500 microARNs en bases de datos públicas (Tabla Suplementaria 1) y se cree que regulan más de un tercio de todos los genes que codifican proteínas. Esto convierte a los microARNs en uno de los reguladores más abundantes de la expresión génica en humanos. Los microARNs se han asociado con una amplia gama de procesos normales y patológicos, incluidas las enfermedades cutáneas inflamatorias crónicas (Figura 9) [Esteller., 2011; O'Connell et al., 2012; Ghafouri-Fard et al., 2020].

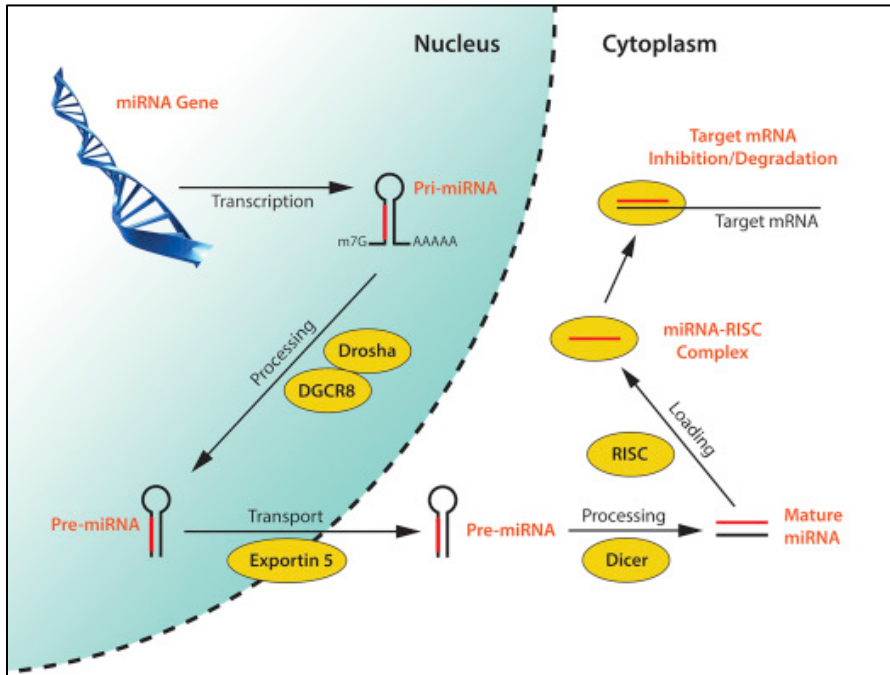


Figura 8: Modelo de biogénesis de microARNs y regulación postranscripcional de genes. Los genes de microARN son transcritos por la ARN polimerasa II o la ARN polimerasa III en transcripciones de microARN primarias, conocidas como pri-miARN. Los pri-miARNs luego se doblan en horquillas, que sirven como sustratos para una enzima RNasa III, Drosha (RNASEN) y su “socio” DGCR8 (región crítica 8 de DiGeorge). Drosha escinde endonucleóticamente los pri-miARN de cadena larga en pre-miARN de aproximadamente 70 nucleótidos. Los pre-miARN son luego exportados al citoplasma por XPO5 (Exportin 5). Una vez fuera del núcleo, el bucle de pre-miARN es escindido por otra enzima de la familia de RNasa conocida como Dicer, generando un dúplex de microARN de aproximadamente 22 nucleótidos. Una hebra

de este dúplex de microARN se carga luego en el complejo silenciador inducido por ARN (RISC). El complejo miARN-RISC ya cargado interactúa con la región no traducida 3' (3' UTR) de los genes de ARNm diana donde se une y altera la traducción o desencadena la degradación del ARNm [Hawkes et al., 2016].

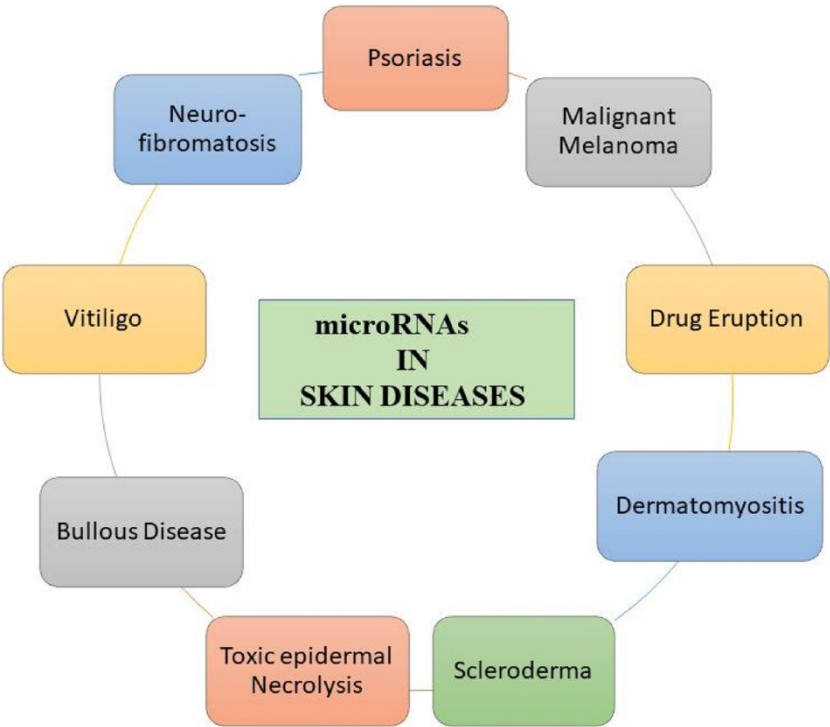


Figura 9: Enfermedades dermatológicas vinculadas con alteraciones en los microARNs. [Singhvi et al., 2018].

Actualmente, los métodos más utilizados para estudiar perfiles de microARNs son los microarrays de 384 pocillos, con un gran rendimiento, y la secuenciación masiva o *Next Generation Sequencing* (NGS) de ARNs pequeños, mientras que el Northern blot y la RT-PCR cuantitativa o en tiempo real (qRT-PCR) simple se utilizan para verificar y confirmar microARNs con alta sensibilidad (Tabla 2).

Métodos	Resultado	Ventajas	Desventajas
Northern-blot	Verificar y confirmar microARNs.	Alta especificidad.	No puede realizar detecciones de alto rendimiento. Baja sensibilidad.
qRT-PCR simple	Análisis cuantitativo de microARNs con baja expresión. Verificar y confirmar microARNs.	Alta sensibilidad y rango dinámico.	No puede realizar detecciones de alto rendimiento. No puede identificar nuevos microARNs.
Microarrays	Análisis de perfiles de microARNs.	Alto rendimiento.	Baja calidad, estabilidad y reproducibilidad. No cuantitativo. Baja especificidad. No se pueden identificar nuevos microARNs.
Secuenciación de ARN	Análisis cuantitativo de microARNs que permite identificar nuevos microARNs.	Alta especificidad.	Análisis de cálculo complejo. Ineficiente (coste elevado).

Tabla 2: Métodos actuales para el estudio de microARNs. RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa; qRT-PCR: RT-PCR cuantitativa o en tiempo real.

3.3.3. Función inmunológica de los microARNs en la psoriasis.

En los estudios sobre perfiles de microARNs que utilizaron biopsias de piel psoriásica, alrededor de un centenar de microARNs se expresaban de manera diferencial en piel psoriásica en comparación con piel sana, y la mayoría de las alteraciones más relevantes de estos microARNs estaban acompañadas por inflamación e hiperproliferación celular elevadas. Progresivamente, se notifican más microARNs relacionados con la enfermedad en lesiones psoriásicas y distintos patrones de expresión de microARNs pueden diferenciar la psoriasis de la piel sana y del eccema atópico, en particular miR-21, miR-125b, miR-146a y miR-203. Sin embargo, los mecanismos reguladores están lejos de ser bien entendidos [Zibert et al., 2010; Løvendorf et al., 2010; Meisgen et al., 2012; Liu et al., 2017].

Interacción de microARNs con potenciales dianas en psoriasis

Después de que los genes de los microARNs se transcriban en transcripciones primarias largas, una hebra del par dúplex de microARN se asocia con una proteína Argonaute (Ago) para formar un complejo de silenciamiento funcional miRISC, que es guiado por microARN maduro para dirigirse al ARNm. El microARN puede desencadenar la escisión endonucleolítica catalizada por Ago del ARNm diana, lo que lleva a la represión de la traducción o la descomposición del ARNm. Además, la 4-hidroxilación de Prolyl parece desempeñar un papel importante en esta interacción entre el

microARN y su diana al regular la estabilidad de Ago. Por el momento, se han descrito múltiples microARNs y sus interacciones con ARNm o proteínas. La transcripción del microARN miR-31 puede inducir la activación de NF- κ B desencadenada por citoquinas inflamatorias y, además, participar en la regulación del ciclo celular al tener como diana a la proteína fosfatasa 6 de progresión de la fase G1 a S (ppp6c). Otro microARN disregulado en la piel psoriásica es el miR-26b-5p, cuya expresión se encuentra aumentada en el tejido adiposo subcutáneo de piel psoriásica lesional y que regula la hidrolasa éster de colesterol neutro (NCEH1). Aunque no en la psoriasis, miR-21 es regulado positivamente por STAT3 y SHIP2 es diana de miR-205 en la apoptosis. MiR-143 se dirige contra SLC26A4 y miR-223 contra GLUL, SMAD3. De acuerdo con las interacciones de microARN-ARNm diana, los microARNs son reguladores potenciales en las vías de señalización celular. Los microARNs más relevantes alterados en la psoriasis y sus dianas y funciones biológicas se muestran en la Tabla Suplementaria 2. [Qi et al., 2008; Yi et al., 2008; Zibert et al., 2010; Løvendorf et al., 2014; Liu et al., 2017].

En la Figura 10 se muestra un ejemplo del mecanismo de acción de dos microARNs en la psoriasis.

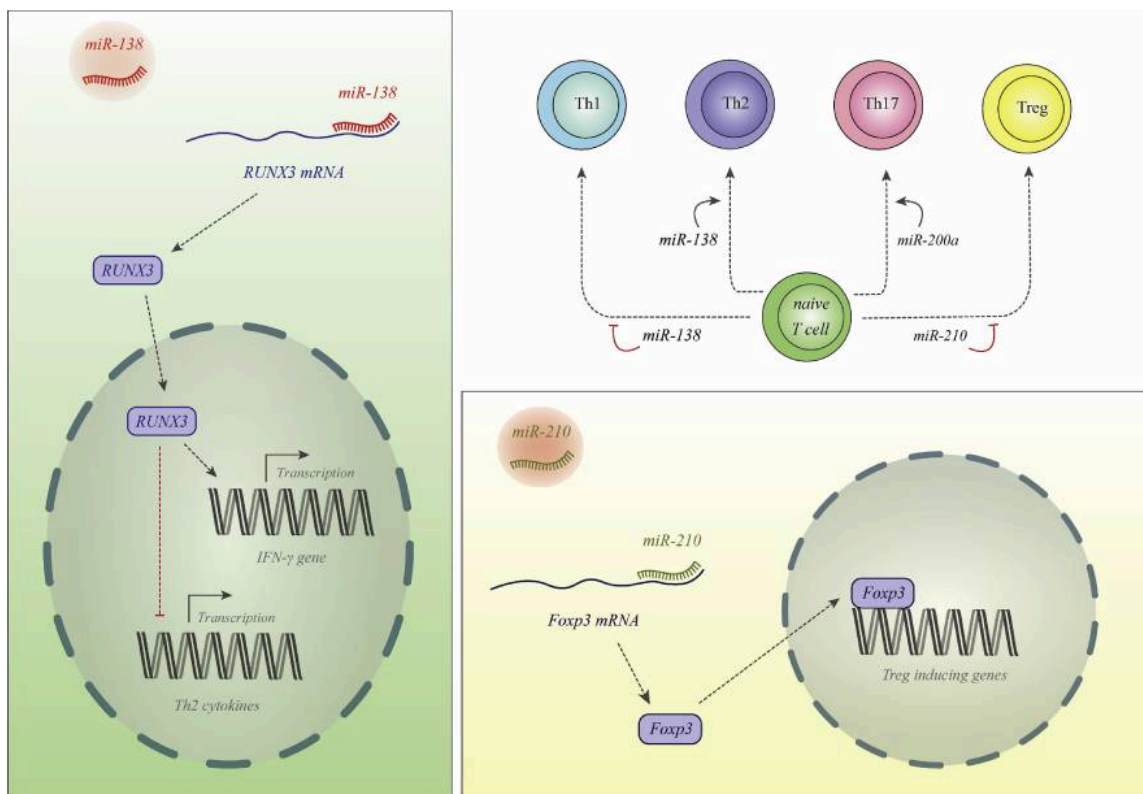


Figura 10: Mecanismo de acción de miR-138 y miR-210 en psoriasis.

MiR-138 está disminuido en pacientes con psoriasis. Este microARN se une con 3'UTR de RUNX3 para suprimir su expresión. Por ello, la regulación a la baja de miR-138 conduce a la regulación al alza de RUNX3, lo que aumenta la relación entre las células T cooperadoras (Th) Th1/Th2. MiR-210 aumenta en la psoriasis. Este microARN se une con 3'UTR de FOXP3. FOXP3 es un factor de transcripción para la diferenciación de las Treg. Por lo tanto, la sobreexpresión de miR-210 conduce a una reducción en el número de estas células T [Ghafouri-Fard et al., 2020].

Regulación de la proliferación y la actividad inflamatoria de queratinocitos por microARNs

La psoriasis se caracteriza por una intensa hiperproliferación y una diferenciación anómala de los queratinocitos, acompañada de una producción por estas células de citoquinas y quimioquinas inflamatorias, en las que se ha comprobado que está involucrado un perfil de expresión de microARNs específico. Por un lado, los microARNs modulan la proliferación de queratinocitos a través de las protein-quinasas activadas por mitógenos (MAPK)-1, el receptor del factor de crecimiento (FGFR)-2 y SOCS-3. MiR-424 actúa inhibiendo MAPK1 o la ciclina E1, mientras que miR-125b media la proliferación de queratinocitos dirigiéndose contra FGFR2. El miR-203 (expresado por queratinocitos) se dirige contra el inhibidor de STAT, SOCS-3, promoviendo así la hiperproliferación de los queratinocitos. Además, miR-21, miR-205, miR-221 y miR-222 participan en la modulación del crecimiento celular y la apoptosis de estas células. El miR-136 se ha establecido como un elemento regulador durante la detención de la proliferación inducida por TGF- β 1 al regular la expresión de PPP2R2A en los queratinocitos. La expresión del miR135b puede inducir el aumento del factor de crecimiento epidérmico (EGF), mientras que la inhibición de miR135b puede aumentar el potencial proliferativo y mejorar el microambiente de las células basales. Como algunas de las moléculas diana de los microARNs (por ejemplo, MAPK1 y ciclina E1) pueden pertenecer a la misma vía de señalización para la regulación

del ciclo celular, estas interacciones microARN-mRNA pueden regular la proliferación celular de forma más eficaz que al inhibir estas moléculas individualmente. Algunos microARNs, como el miR-125, se expresan en todas las capas de la epidermis, lo que indica que las funciones de estos microARNs en la piel pueden estar mediadas por diferentes conjuntos de genes diana en las distintas capas de células basales y suprabasales [Zibert et al., 2010, Xu et al., 2013; Zhao et al., 2014; Ghafouri-Fard et al., 2020].

Por otro lado, los microARNs también modulan la producción de citoquinas y quimioquinas de los queratinocitos. El miR-31, uno de los microARNs más sobreexpresados en la psoriasis, podría modular en queratinocitos la producción de IL-1 β , CXCL1/5/8 e IL-8 al dirigirse a STK40, un regulador negativo de NF- κ B. TGF- β 1 actúa como un regulador de miR-31 in vitro e in vivo. Por lo tanto, las citoquinas/quimioquinas inflamatorias son inducidas por los microARNs, lo que contribuye a la activación de las células endoteliales, la atracción de leucocitos y, clínicamente, la inflamación de la piel [Xu et al., 2013, Liu et al., 2017].

Modulación de la disfunción inmune de células T por microARNs

Los microARNs participan en la regulación de la homeostasis inmunitaria y la inflamación modulando la activación y la proliferación de las células T, entre otras funciones. Se ha descrito que la expresión

disminuida de miR-138 en las células T CD4+ de pacientes con psoriasis induce una mayor expresión del factor de transcripción 3 relacionado con runt (RUNX3), favoreciendo así un aumento en la proporción de Th1/Th2. El miR-223 es otro microARN importante para la función de los linfocitos; se expresa en células Th17, lo que implica que miR-223 podría desempeñar algún papel en el aumento de la producción de IL-17 en estas células. La disminución de miR-223 aumenta significativamente la proliferación de células T CD8+, específicas de antígeno mediada por LC. Las células Treg son esenciales para limitar la inflamación crónica en la psoriasis, siendo FOXP3 necesaria para el desarrollo y la función de estas células. La sobreexpresión de miR-210 podría inhibir su diana, FOXP3, alterando la función de las células Treg en la psoriasis, mientras que la inhibición de miR-210 revertiría esta disfunción inmunitaria. La ablación de microARNs en las Treg genera fenotipo similar al de la pérdida de células FOXP3+, indicando que los múltiples mecanismos inmunosupresores utilizados por las células Treg son finalmente controlados por microARNs. No sólo la función de las células T, sino también su crecimiento y su apoptosis pueden ser modulados por microARNs. La expresión de los miR-142-3p/-5p aumenta durante la proliferación de células T inducida por antígenos en ratones, mientras que el miR-21 suprime la apoptosis de células T en la psoriasis. MiR-125b disminuye ante la activación de células T CD4+ *naïve*. Con respecto a las células iNKT, los microARNs también son potentes reguladores de su desarrollo, función y homeostasis

[Zibert et al., 2010; Zhao et al., 2014; Zhou et al., 2014; Ghafouri-Fard et al., 2020].

Los microARNs también modulan la producción de citoquinas y quimioquinas de las células T. MiR-19a y miR-130a, microARNs circulantes, se asocian con la vía de señalización de TNF- α en la psoriasis y la sobreexpresión de miR-210 en células T CD4⁺ normales podría inducir la producción de IFN - γ , IL-17 e inhibir la IL-10 y el TGF- β [Oyama et al., 2011; Liu et al., 2017].

En las Tablas Suplementarias 3 y 4 se resumen los microARNs regulados a la baja o al alza en la psoriasis.

En la Figura 11 se resumen los distintos papeles de los microARNs en la modulación de los distintos mecanismos de la inmunopatogenia de la psoriasis.

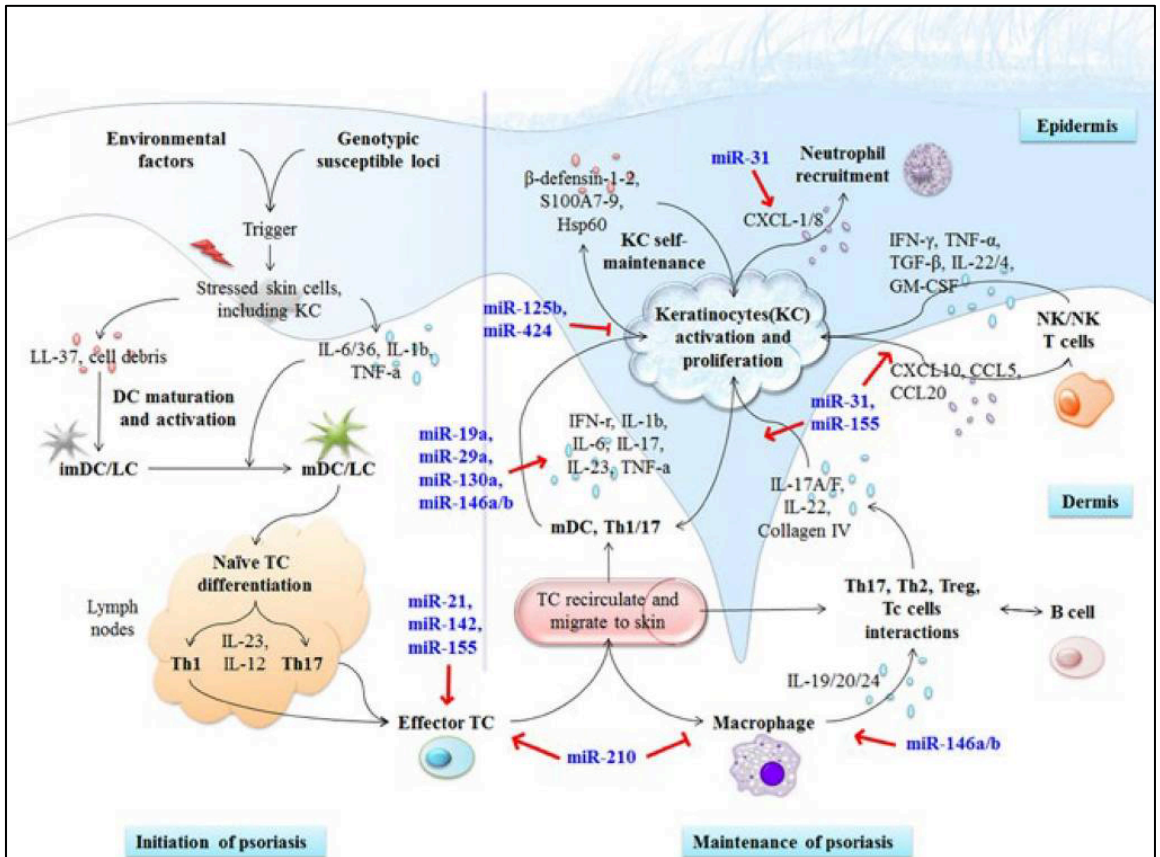


Figura 11: Papeles de los microARNs en la modulación de los distintos mecanismos de la inmunopatogenia de la psoriasis. Tanto la red de interacción celular como la red de citoquinas y quimioquinas están reguladas por microARNs, lo que indica un papel fundamental en la inmunopatogénesis de la psoriasis. KC: queratinocito; imDC: célula dendrítica inmadura; mDC: célula dendrítica madura; LC: célula de Langerhans; TC: célula T; NK: célula natural killer; NKT: célula T NK; Treg: célula T reguladora; miR: microARN [Liu et al., 2017].

3.3.4. Los microARNs como potenciales biomarcadores en psoriasis.

Algunas de las propiedades inherentes a los microARNs los hacen muy atractivos como posibles biomarcadores. En primer lugar, están altamente conservados entre especies, lo que permite el uso de modelos animales de enfermedad para estudios preclínicos. En segundo lugar, serían biomarcadores con una alta estabilidad y una relativa facilidad de detección. Por un lado, los microARNs en suero son resistentes a las ribonucleasas circulantes y a condiciones fisicoquímicas extremas, como el almacenamiento prolongado, la congelación-descongelación y el pH extremo. Por otra parte, los microARNs pueden detectarse fácilmente en muestras de sangre de pequeño volumen utilizando qRT-PCR. Además, no sólo se han aislado en suero y plasma, sino también en la mayoría de los demás fluidos/tejidos corporales. La incorporación progresiva de nuevos microARNs, cuya regulación está alterada de forma específica a la fisiopatología de la psoriasis, ha provocado que, actualmente, exista un interés creciente en el estudio de los microARNs circulantes o tisulares como biomarcadores en la psoriasis, así como en otras enfermedades inmológicas [Cuperus et al., 2011; Bahn et al., 2015; Ghafouri-Fard et al., 2020].

MicroARNs como marcadores diagnósticos y de gravedad en psoriasis

Existe un perfil de expresión de microARNs específico en la psoriasis. En concreto, su presencia en sangre periférica ha sido objeto de múltiples estudios. Se ha descrito que el miR-223 y el miR-143 están significativamente aumentados en monocitos de sangre periférica de los pacientes con psoriasis (estos microARNs también se han correlacionado significativamente con la puntuación en la escala PASI). El análisis de curvas ROC ha demostrado que miR-223 y miR-143 tienen el potencial de distinguir entre psoriasis y controles sanos, sugiriendo su utilidad como biomarcadores para el diagnóstico o la actividad de la psoriasis [Løvendorf et al., 2014]. MiR-19a, un microARN sérico regulador de TNF- α , está significativamente aumentado sólo en la psoriasis, mostrando diferencias significativas en el análisis ROC [Oyama et al., 2011]. El miR-424 sérico refleja la actividad proliferativa de los queratinocitos, mientras que los niveles séricos de miR-1266, un regulador de IL-17A, en pacientes con psoriasis presenta correlaciones inversas débiles con las puntuaciones en la escala PASI y las áreas de superficie corporal (BSA). Por otro lado, los niveles de miR-125b, miR-146a, miR-203 y miR-205 en suero disminuyen significativamente en pacientes con psoriasis en comparación con sujetos normales [Liu et al., 2017]. Además de los elementos circulantes sanguíneos, también se han aislado microARNs en la mayoría de los demás fluidos y tejidos corporales. Se ha realizado secuenciación de ARN en piel, para estudiar

la expresión de miR-193b y miR-223, encontrando una disminución en la epidermis y en los infiltrados inflamatorios dérmicos de la piel psoriásica lesional en comparación con la piel psoriásica normal. El miR-223 controlaría la migración de células inflamatorias mediante la regulación de moléculas inflamatorias. El estudio en tallo de pelo mostró, en comparación con controles normales y pacientes con dermatitis atópica, que el miR-19a y el miR-424 se regulan significativamente al alza en pacientes con psoriasis. [Løvendorf et al., 2015; Liu et al., 2017].

El estudio de los niveles de miR-369-3p en suero y piel en pacientes con psoriasis ha confirmado su correlación con la gravedad de la enfermedad, presentando estos niveles de miR-369-3p en piel una relación lineal positiva con las puntuaciones en la escala PASI. Se han obtenido resultados similares en la investigación de miR-223 y miR-143 [Løvendorf et al., 2014; Deng et al., 2015]. Sin embargo, algunos estudios no han encontrado una relación anticipada del cambio de microARNs con la gravedad de la psoriasis. Por tanto, aunque algunos de los microARNs séricos podrían usarse como posibles biomarcadores de la gravedad de la enfermedad, se necesitan más estudios para encontrar asociaciones universalmente extrapolables entre los microARNs y la gravedad de la enfermedad, sin poder confirmar que los cambios de estos niveles de microARNs puedan estar relacionados con el tratamiento biológico o sistémico de la psoriasis [Ghafouri-Fard et al., 2020].

MicroARNs como marcadores de respuesta terapéutica

También se ha explorado el impacto de las terapias sistémicas en microARNs específicos relacionados con la psoriasis. La terapia con ultravioleta B de banda estrecha da como resultado disminuciones epidérmicas de miR-21 y aumentos en p53 y miR-125b [Gu et al., 2011]. El papel de los microARNs en la respuesta a la fototerapia también está respaldado por el hallazgo de que el miR-4516 regula negativamente la expresión de STAT3 y la apoptosis en los queratinocitos expuestos al tratamiento con psoraleno más UVA [Chowdhari et al., 2014].

La alteración de los microARNs después del tratamiento no es exclusiva de la fototerapia. MiR-143 y miR-223 están significativamente elevados en los monocitos de sangre periférica de pacientes con psoriasis no tratada y, posteriormente, disminuyen después de la terapia con metotrexato [Løvendorf et al., 2014]. También se ha publicado acerca del aumento en suero de 38 microARNs después de realizar un tratamiento con etanercept [Pivarcsi et al., 2013]. Estos cambios específicos en el perfil de microARNs, posteriormente al tratamiento, obtenidos en pacientes que respondieron al tratamiento con etanercept, no se observaron en pacientes tratados con metotrexato. Además, los cambios en el perfil de expresión de microARNs en la piel de pacientes con psoriasis tratados con adalimumab no se encontraron 4 días después de la primera inyección, pero sí a las 2 semanas [Raaby et al., 2015]. Estos

hallazgos sugieren que la alteración de los perfiles de expresión de microARNs después de los tratamientos de psoriasis sistémica es algo específica para cada tratamiento, podría usarse como predictor de la eficacia del tratamiento y puede cambiar en distintos momentos durante el período de tratamiento.

En resumen, estos datos anteriores sugieren que ciertos microARNs podrían desarrollarse como marcadores de diagnóstico, algunos podrían servir para monitorizar o incluso predecir la respuesta a distintos tratamientos, mientras que otros podrían usarse como biomarcadores para reflejar la gravedad de la psoriasis. Sin embargo, probablemente no todos los microARNs con importantes efectos de modulación inmunológica se puedan convertir en buenos biomarcadores. Además, los procedimientos de detección de microARNs como biomarcadores aún no están completamente establecidos. Otro requisito previo para desarrollar diagnósticos basados en microARNs tisulares o circulantes es la capacidad de cuantificar microARNs en esas localizaciones con suficientes sensibilidad y precisión.

El considerable impacto de la psoriasis en los pacientes y las comorbilidades asociadas a esta enfermedad resaltan la importancia de dilucidar los detalles moleculares de la inmunopatogénesis de este trastorno inflamatorio. Es fundamental que los estudios de psoriasis

en curso evalúen nuevos mecanismos de regulación epigenética de la expresión génica, incluido el silenciamiento génico postranscripcional mediado por microARNs. A medida que aumenta nuestra comprensión de la fisiopatología de la psoriasis, se puede anticipar que los microARNs emergerán como actores prominentes en el desarrollo de esta y otras afecciones inflamatorias crónicas.

3.4. Terapias biológicas actuales en psoriasis.

El conocimiento cada vez más profundo de la fisiopatología de la psoriasis se ha acompañado del desarrollo de múltiples anticuerpos monoclonales que tienen como diana distintos mediadores clave que participan en la cascada inflamatoria de la psoriasis. Debido a su relevancia en el estudio desarrollado en este trabajo doctoral, se resumen en la Tabla 3 las terapias biológicas actuales empleadas en el tratamiento de la psoriasis y sus principales características.

Fármaco	Diana	Características principales
Infliximab	TNF- α	Anticuerpo monoclonal IgG1 quimérico (regiones constantes de anticuerpos humanos y regiones variables murinas) que se une y neutraliza la actividad biológica del TNF- α al unirse al TNF- α soluble y unido a la membrana. Administración intravenosa.
Etanercept	TNF- α	Proteína de fusión del receptor de TNF humano recombinante. Consiste en dos dominios extracelulares de unidades receptoras de TNF solubles humanas que se unen al TNF- α , tanto soluble como unido a la membrana, y un fragmento Fc de IgG humana que estabiliza la molécula. Como molécula dimérica, puede unirse a dos moléculas de TNF- α y actuar como un inhibidor competitivo del TNF- α endógeno. Administración subcutánea.

Adalimumab	TNF- α	Anticuerpo monoclonal completamente humano del isotipo IgG1 que se une a infliximab similar al TNF- α soluble y unido a la membrana. Administración subcutánea.
Secukinumab	IL-17A	Anticuerpo monoclonal IgG1 anti-IL-17A completamente humano que se une y neutraliza selectivamente IL-17A. La familia de citoquinas IL-17 comprende seis miembros: IL-17A-F. La interleucina-17A es entre 10 y 30 veces más potente que la IL-17F, mientras que el heterodímero IL-17A / IL-17F tiene una actividad intermedia. Administración subcutánea.
Ixekizumab	IL-17A	Anticuerpo monoclonal anti-IL-17A IgG4 humanizado que, al igual que el secukinumab, neutraliza la IL-17A. Administración subcutánea.
Brodalumab	IL-17R	La familia de receptores de IL-17 comprende cinco subunidades de receptores IL-17RA-IL-17RE. Brodalumab es un anticuerpo monoclonal anti-IL-17RA IgG2 completamente humano y, por lo tanto, bloquea a los miembros de la familia de IL-17 que actúan a través de IL-17RA, incluidos IL-17A, IL-17A/F, IL-17F, IL17C e IL-17E. Administración subcutánea.
Ustekinumab	IL-12, IL-23 p40	Anticuerpo monoclonal IgG1 humano que se dirige a la subunidad proteica compartida p40 de IL-12 e IL-23. De ese modo inhibe la acción de estas dos citoquinas, secretadas por las células dendríticas mieloides tras la activación y diferenciación de las células T <i>naïve</i> en células Th1 y Th17. Administración subcutánea.

Guselkumab	IL-23 p19	Anticuerpo monoclonal de IgG1λ completamente humano anti-IL-23, producido en células de ovario de hámster chino (CHO) mediante tecnología de ADN recombinante. Administración subcutánea.
Tildrakizumab	IL-23 p19	Anticuerpo monoclonal de tipo IgG1κ humanizado que se une de forma específica a la subunidad p19 de la citoquina IL-23, sin unirse a la IL-12, e inhibe su interacción con el receptor de IL-23. Administración subcutánea.
Risankizumab	IL-23 p19	Anticuerpo monoclonal humanizado de tipo IgG1 que se une selectivamente y con alta afinidad a la subunidad p19 de la interleuquina IL-23, sin unirse a la IL-12, e inhibe su interacción con el complejo receptor IL-23. Administración subcutánea.

Tabla 3: Terapias biológicas actuales en psoriasis. Fc: fragmento cristalizable; Ig: inmunoglobulina; IL: interleuquina; TNF: factor de necrosis tumoral [Von Csiky-Sessoms et al., 2019].

En la Figura 12 se resumen las distintas dianas específicas de cada tratamiento biológico en la psoriasis y su papel en inmunopatogenia de la enfermedad.

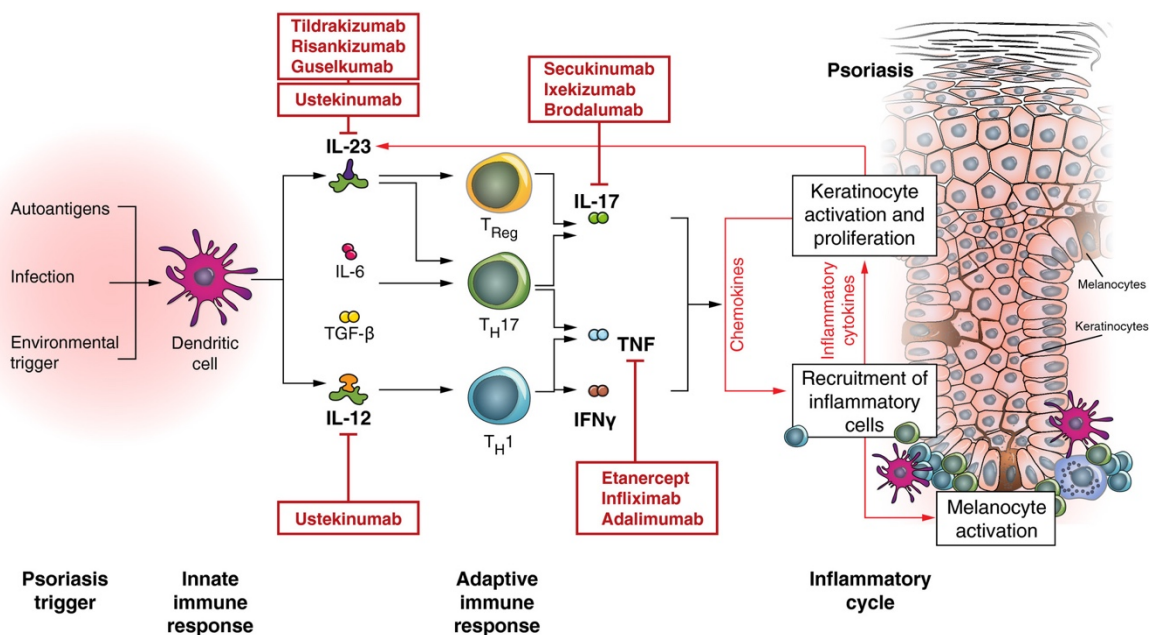


Figura 12: Dianas específicas de las distintas terapias biológicas disponibles en psoriasis. DC: célula dendrítica; IFN: interferón; IL: interleuquina; TGF: factor de crecimiento de transformación; Th: célula T cooperadora; TNF: factor de necrosis tumoral; Treg: célula T reguladora [Girolomoni et al., 2017].

4. Objetivos generales del estudio:

Estudiar el papel de los microARNs en piel de pacientes con psoriasis como biomarcadores de gravedad y respuesta a tratamiento, así como su papel en suero como biomarcadores predictores de riesgo y gravedad para la psoriasis y otras enfermedades inflamatorias mediadas por la respuesta inmune.

5. Estudio 1: Expresión de microARNs en piel psoriásica y su asociación con mejoría de la enfermedad.

5.1. Objetivos específicos:

- I. Caracterizar en pacientes con psoriasis la expresión cutánea de microARNs no asociados previamente a esta patología.
- II. Evaluar la influencia de factores demográficos y clínicos en la expresión en piel de microARNs recién identificados, así como en la de miR-31-5p, miR-378a, miR-135b, miR-142-3p y miR-146a-5p (anteriormente asociados con la psoriasis).
- III. Evaluar la expresión cutánea de los microARNs tras el tratamiento con agentes biológicos y su asociación con la gravedad de la enfermedad y la mejora del Índice de Severidad y Área de Psoriasis (PASI) tras el tratamiento.
- IV. Estudiar el significado fisiopatológico de la expresión de los microARNs en psoriasis según su vinculación previa con dianas genéticas.

5.2. Material y Métodos.

5.2.1. Población del estudio y recogida de muestras.

El estudio fue aprobado por el comité ético independiente del Hospital Universitario de la Princesa y realizado según los principios de la Declaración de Helsinki.

Se seleccionaron 5 pacientes con psoriasis en placas moderada-grave y 5 sujetos sanos como población control. Se realizaron técnicas de secuenciación masiva (NGS por sus siglas en inglés: *Next Generation Sequencing*) para microARN (SOLiDv4) en muestras de piel lesional (L) y no lesional (NL) de los pacientes con psoriasis, así como en piel sana (H) de la población control. Posteriormente, los datos obtenidos mediante las NGS se validaron mediante RT-PCR en 44 pacientes adicionales con psoriasis. Todos los pacientes tenían un Índice de Severidad y Área de Psoriasis (PASI) ≥ 10 (Figura Suplementaria 1). Antes de la obtención de las muestras de piel se establecieron los siguientes períodos de lavado: 28 días para tratamientos sistémicos convencionales y 84 días para agentes biológicos. Las muestras cutáneas se obtuvieron mediante sacabocados de 4mm: en el caso de los pacientes psoriásicos, de las placas de psoriasis y de piel sin lesiones con una distancia de al menos 5 cm de la placa más cercana; en el caso de los sujetos control, de piel sana sin lesiones objetivables. Las muestras se tomaron preferentemente de áreas no expuestas al sol. En 15 de 44 pacientes, se obtuvo una muestra de piel adicional

(sacabocados de 2mm) después de 3 meses de tratamiento (anti-IL-12/23, n = 8; anti-TNF α , n = 4; anti-IL-17, n = 3). En estos casos, la biopsia de piel se tomó de un área con una placa de psoriasis previa que se había resuelto durante el tratamiento.

5.2.2. Técnica de secuenciación masiva (NGS) para la detección de microARNs diferencialmente expresados en biopsias de piel.

La técnica de NGS se realizó utilizando la plataforma SOLiD v4 en Sistemas Genómicos (Valencia, España). La calidad y la cantidad de ARN se evaluaron utilizando el bioanalizador Agilent 2100 y el fluorímetro Qubit 2.0. Las bibliotecas se prepararon siguiendo los protocolos de Life Technologies para secuenciación SOLiD v4. La calidad de las bibliotecas se evaluó utilizando Qubit y Agilent 2100 Bioanalyzer. Se realizó un análisis de expresión diferencial con un cambio mínimo de ± 2 veces para comparar la expresión de microARNs conocidos que fueron identificados por BedTools y miRDeep2.

Los fragmentos de secuenciación se procesaron mediante Fast QC (www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc) para evaluar la calidad de lectura y Cutadapt para delimitar dichos fragmentos, eliminando los restos del adaptador de Illumina y descartando los que tenían menos de 30 pares de bases.

Los fragmentos resultantes se alinearon con una referencia de transcriptoma humano (ensamblaje GRCh38, liberación 91) y la expresión génica se cuantificó con RSEM (*RNA-Seq by Expectation-Maximization*) [Li et al., 2011]. Los recuentos brutos se procesaron con una secuencia de análisis que utilizó el paquete Bioconductor Limma [Liu et al., 2015] para la normalización (utilizando el método TMM - media truncada de M-valores-) y las pruebas de expresión diferencial, teniendo en cuenta sólo aquellos genes expresados a un nivel mínimo de 1 cuenta por millón (CPM) en un número de muestras igual al número de réplicas de la condición con menos réplicas. Se utilizó una variable de bloqueo para definir pares de muestras obtenidas del mismo paciente. Los cambios en la expresión génica se consideraron significativos si estaban asociados a un valor de p ajustado por Benjamini y Hochberg $< 0,05$. Los genes expresados diferencialmente se filtraron adicionalmente seleccionando aquellos con $\text{abs}(\log\text{FC}) > 1$.

5.2.3. Aislamiento de ARN y retro-transcripción.

Se pulverizaron muestras de piel congeladas y se aisló el ARN total usando el minikit miRNeasy (Qiagen). La cantidad y la calidad se evaluaron en Nanodrop y el bioanalizador Agilent 2100. En todos los casos sólo se incluyeron aquellas muestras con un número de integridad de ARN (RIN) > 8 . Se usaron 10 nanogramos de ARN para la

síntesis de ADNc de primera hebra usando el kit de síntesis de ADNc universal II (Exiqon).

5.2.4. Validación mediante RT-PCR de los microARNs diferencialmente expresados.

La RT-PCR se realizó por triplicado utilizando PCR ExiLent SYBR Green (Exiqon) en un sistema de detección de PCR CFX384 (Bio-Rad). La expresión de microARNs se analizó usando conjuntos de cebadores de PCR de microARNs LNA (Exiqon, Aarhus, Dinamarca). Se utilizó el algoritmo Genorm (parte del software Biogazelle qbase+) para identificar los genes de referencia más estables. Los datos se normalizaron utilizando la expresión media geométrica del ARN ribosómico 5S y RNU1A1, identificado como el más estable. Por ello, los datos se expresan como niveles relativos de microARN con respecto a esa media geométrica de 5S y RNU1A1.

5.2.5. Identificación de genes diana de los microARNs.

La identificación de los genes diana para los microARNs se realizó tras reanalizar mediante el análisis de los datos públicos de expresión génica de un estudio publicado previamente en el que se comparaba el perfil transcriptómico de muestras de piel con lesión y sin lesión de 14 pacientes con psoriasis mediante RNASeq GEO (Gene Expression

Omnibus, GSE67785) [Swindell et al., 2015]. Para identificar qué genes estaban siendo regulados por los microARNs diferencialmente expresados en los pacientes con psoriasis se utilizó la herramienta IPA “MicroARN Target Filter” (Ingenuity Pathway Analysis, Qiagen, Hilden, Alemania). En primer lugar, se seleccionaron sólo aquellos genes cuya regulación por microARNs tuviera una validación experimental o cuya posibilidad de ser regulados por un determinado microARN fuera altamente probable. Posteriormente, se filtraron los pares gen-microARN que interactuaban para mantener sólo aquellos con expresión inversamente correlacionada en muestras de piel lesional vs. no lesional. La colección de genes resultante se sometió a análisis funcional con IPA, para identificar asociaciones con vías canónicas, reguladores ascendentes (*upstream*), enfermedades o funciones biológicas. Como enfoque adicional, los genes diana de microARNs se identificaron utilizando el software miRTarBase, seleccionando sólo aquellos clasificados como “Funcionales”; a posteriori la lista de genes se sometió al Sistema de Clasificación PANTHER (<http://pantherdb.org>) para identificar la asociación con procesos biológicos. Como lista de referencia, se utilizaron genes expresados diferencialmente en piel psoriásica con lesión vs. sin lesión de GEO (GSE67785).

5.2.6. Estudio estadístico.

El efecto de los parámetros demográficos y clínicos sobre la expresión de los microARNs se analizó mediante un modelo lineal generalizado (GLM). Las diferencias entre los grupos fueron comparadas mediante la prueba de T pareada o la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon, según fuera apropiado. Se aplicó una transformación a la expresión de microARNs para lograr una distribución normal con el fin de aplicar pruebas paramétricas. Se utilizó un análisis de regresión múltiple para determinar la asociación de los valores de microARNs con la gravedad de la enfermedad evaluada por PASI. Se realizó una regresión logística multivariable ordinal para analizar la relación entre la expresión de microARNs en piel con lesión o sin lesión y la mejoría evaluada mediante la puntuación PASI. Se aplicó la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples. Los valores de p fueron bilaterales y la significación estadística se consideró como $p < 0,05$. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando R, versión 3.6.1 (<https://www.R-project.org/>).

5.3. Resultados.

5.3.1. Identificación de microARNs diferencialmente expresados en la piel psoriásica.

Para identificar los microARNs candidatos no descritos previamente como expresados diferencialmente en pacientes psoriásicos, se realizó NGS en 5 pacientes con psoriasis (piel lesional y no lesional) y en 5 sujetos sanos. Se detectaron un total de 49 microARNs diferencialmente expresados al menos en una de las siguientes comparaciones: piel sana (H) vs. piel psoriásica no lesional (NL), H vs. piel psoriásica lesional (L) o L vs. NL, con un valor de p ajustado por Bonferroni $< 0,05$. El dendrograma del mapa de calor mostró una mayor similitud entre las muestras H y NL (Figura 13a).

Trece de los 49 microARNs se expresaron diferencialmente (± 2 veces) entre piel NL y H, mientras que un total de 23 microARNs se expresaron diferencialmente en piel L vs. H y 22 en piel L vs. NL (Figura 13b y Tabla 4).

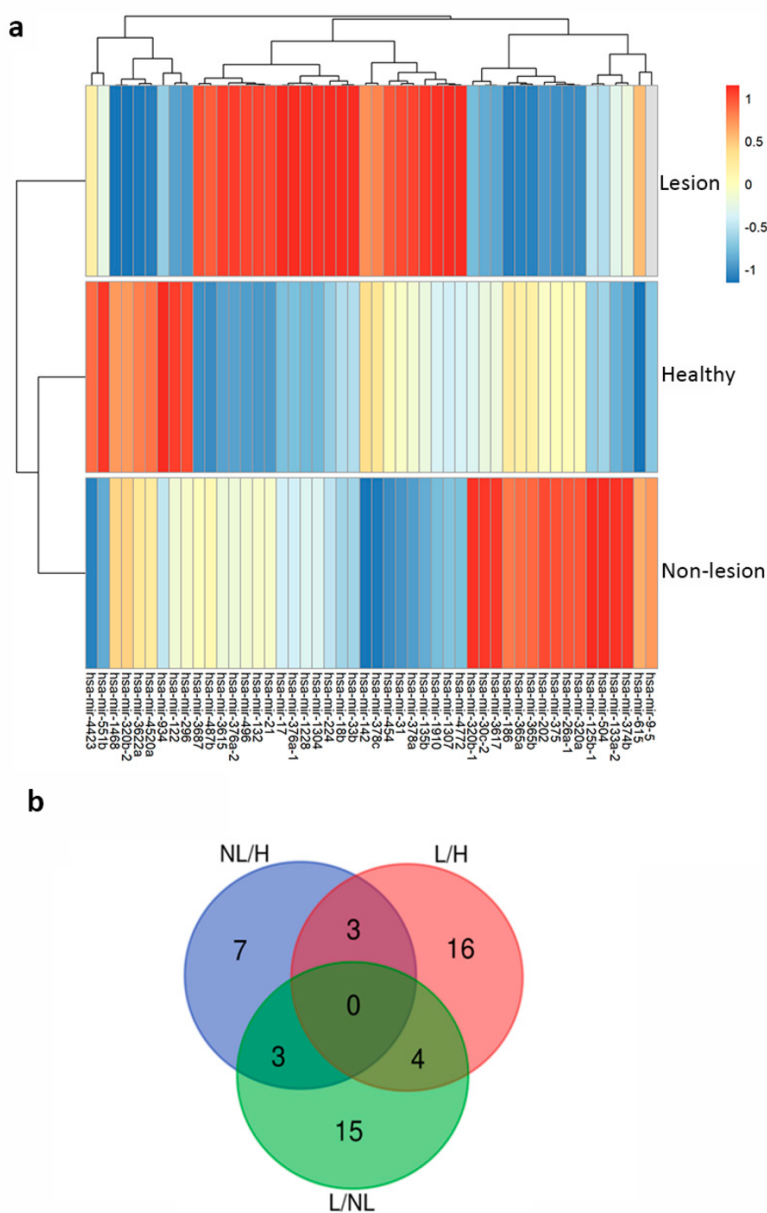


Figura 13: Expresión diferencial de microARNs conocidos en piel sana (Healthy, H), psoriásica no lesional (Non-lesion, NL) y psoriásica lesional (Lesion, L). (a) Mapa de calor del agrupamiento jerárquico de

muestras cutáneas basado en los 49 microARNs expresados diferencialmente. Cada línea representa la media de la z-score en el grupo indicado. (b) Diagrama de Venn indicando el número de microARNs que se expresaron diferencialmente > 2 veces en cualquiera de las tres comparaciones. Los datos corresponden a muestras cutáneas de 5 pacientes con psoriasis y 5 sujetos sanos.

De los resultados de la NGS, seleccionamos 12 microARNs para su estudio y validación en las muestras de piel de la cohorte más grande de 44 pacientes, utilizando RT-PCR. De estos 12 microARNs, seleccionamos 8 como representantes de cada grupo, que no habían sido previamente validados en psoriasis: miR-9-5p, miR-375 y miR-33b que habían mostrado diferencias en piel L vs. NL; miR-3145, miR-3687 y miR-934 que mostraron diferencias en piel L vs. H y, finalmente, miR-133a-3p y miR-614 habían mostrado diferencias en piel NL vs. H (Tabla 5).

miRNA ID	FC ^a	p-val ^a	FC ^b	p-val ^b	FC ^c	p-val ^c
hsa-mir-31	11.460	0.0001	2.219	0.1779	-5.163	0.0037
hsa-mir-9-5p	"-inf"	0.0045	"-inf"	0.0202	2.437	0.3574
hsa-mir-378a	4.163	0.0002	1.984	0.0821	2.097	0.0282
hsa-mir-378c	3.766	0.0017	1.335	0.5354	-2.820	0.0074
hsa-mir-135b	3.956	0.0039	1.771	0.0876	-2.233	0.1647
hsa-mir-33b	3.794	0.0046	4.276	0.0041	1.1268	0.8742
hsa-mir-375	-5.721	0.0060	-2.777	0.0624	2.059	0.2674
hsa-mir-4772	3.799	0.0109	2.279	0.0561	-1.666	0.4085
hsa-mir-454	2.457	0.0130	1.499	0.3140	-1.638	0.1091
hsa-mir-186	-2.652	0.0156	-2.055	0.0758	1.290	0.445
hsa-mir-365a	-2.656	0.0175	-1.997	0.0938	1.329	0.4097
hsa-mir-365b	-2.581	0.0203	-1.889	0.1153	1.366	0.3847
hsa-mir-30c-2	-2.234	0.0221	-1.225	0.3681	1.824	0.1298
hsa-mir-320b-1	-5.897	0.0226	-2.821	0.1939	2.090	0.2395
hsa-mir-18b	4.916	0.0228	3.361	0.0362	-1.462	0.7102
hsa-mir-26a-1	-2.347	0.0307	-1.547	0.2061	1.516	0.3076
hsa-mir-202	-2.789	0.0316	-2.367	0.1297	1.178	0.4687
hsa-mir-142	2.684	0.0326	1.243	0.6770	-2.158	0.0672
hsa-mir-3687	-10.245	0.0339	-2.210	0.2952	4.634	0.1849
hsa-mir-320b-2	-3.108	0.0344	-2.621	0.0273	1.185	1
hsa-mir-1307	2.497	0.0390	2.035	0.0798	-1.227	0.6602
hsa-mir-320a	-3.174	0.0438	-2.035	0.2446	1.559	0.3141
hsa-mir-1468	-3.780	0.0482	-3.130	0.0388	1.207	1
hsa-mir-615	-1.423	0.8773	3.822	0.0090	5.442	0.0052
hsa-mir-133a-2	-2.084	0.1979	2.562	0.1359	5.341	0.0064
hsa-mir-551b	1.4294	0.3447	-1.597	0.1742	-2.283	0.0223
hsa-mir-3687	1.657	0.4717	6.593	0.0030	3.979	0.0256
hsa-mir-3145	10.3349	0.2110	inf	0.0025	inf	0.0403
hsa-mir-4423	1.893	0.0992	-1.258	0.5818	-2.381	0.0273
hsa-mir-21	2.434	0.2828	5.328	0.0010	2.188	0.0306
hsa-mir-504	-2.132	0.0745	1.470	0.8375	3.135	0.0372
hsa-mir-125b	-2.341	0.0982	1.026	0.7754	2.404	0.0395
hsa-mir-374b	-1.628	0.2777	1.375	0.3396	2.239	0.0396
hsa-mir-4687	-1.135	0.9760	3.238	0.0613	3.677	0.0553
hsa-mir-934	-8.436	0.0663	-31.291	0.0020	-3.709	0.1355
hsa-mir-3615	1.268	0.2911	2.817	0.0098	2.221	0.1215
hsa-mir-122	-7.776	0.0766	-11.719	0.0163	-1.507	0.4682
hsa-mir-17	1.975	0.1671	2.085	0.0253	1.055	0.4461
hsa-mir-376a-2	1.805	0.3578	3.066	0.0257	1.698	0.2085
hsa-mir-1304	2.228	0.2281	3.522	0.0268	1.580	0.3448
hsa-mir-376a-1	2.428	0.1821	2.839	0.0297	1.168	0.4614
hsa-mir-296	-2.003	0.1878	-2.400	0.0336	-1.198	0.4471
hsa-mir-1228	1.225	0.3524	3.987	0.0337	3.254	0.2118
hsa-mir-224	1.949	0.1184	2.045	0.0349	1.049	0.6413
hsa-mir-1468	-3.780	0.0482	-3.130	0.0388	1.207	1
hsa-mir-3622a	-3.532	0.0658	-3.275	0.0395	1.078	0.8768
hsa-mir-4520a	-2.271	0.2600	-4.489	0.0447	-1.654	0.3732
hsa-mir-132	1.344	0.4658	2.125	0.0451	1.580	0.2158
hsa-mir-496	1.5690	0.6252	7.634	0.0453	4.865	0.1267
hsa-mir-1910	10.2481	0.1410	10.382	0.0487	1.013	0.6984
hsa-mir-487b	1.255	0.6141	2.073	0.0488	1.651	0.1508

Tabla 4: Expresión diferencial de microARNs en piel sana (H), psoriásica no lesional (NL) y psoriásica lesional (L). ^aPiel L vs. NL, ^bPiel L vs. H, ^cPiel NL vs. H. Los valores de p corresponden a la p ajustada por Bonferroni. FC: Fold change; cambio porcentual.

ID	Fold Change ^{a,b,c}	p-val
hsa-mir-31-5p	11,4607802 ^a	0,000108979
hsa-mir-378a	4,16345336 ^a	0,000259515
hsa-mir-135b-5p	3,956695567 ^a	0,003991344
hsa-mir-9-5p	"-inf" ^a	0,004577766
hsa-mir-375	-5,721231656 ^a	0,006054568
hsa-mir-33b	4,27637697 ^c	0,004110427
hsa-mir-3145	inf ^c	0,00258317
hsa-mir-133a-3p	5,341909193 ^b	0,006448522
hsa-mir-3687	6,593690863 ^c	0,003087092
hsa-mir-615	5,442890822 ^b	0,005291634
hsa-mir-934	-31,29178488 ^c	0,002017792
hsa-mir-142-3p	2,68 ^a	0,032614484

Tabla 5: MicroARNs seleccionados mediante secuenciación de nueva generación (NGS). Fold change (cambio porcentual) ^aPiel psoriásica lesional vs. no lesional, ^bPiel psoriásica lesional vs. sana, ^cPiel psoriásica no lesional vs. sana. Los valores de p corresponden a la p ajustada por Bonferroni.

Para la fase de validación se incluyeron además cuatro microARNs como controles debido a su relevancia en la inflamación de la piel psoriásica (miR-31-5p, miR-135b-5p, miR-378a, miR-142-3p) [Hawkes et al., 2016; Masalha et al., 2018]. Aunque no se detectaron diferencias en la expresión de miR-146a-5p mediante NGS, este microARN se incluyó en la fase de validación como control adicional también por su implicación en la psoriasis [Srivastava et al., 2017; Hermann et al., 2017].

5.3.2. Efecto de las variables demográficas y clínicas en la expresión de microARNs.

La influencia de las variables demográficas y clínicas en la expresión de microARNs se analizó en la cohorte de validación de 44 pacientes, para el subconjunto de los 12 microARNs seleccionados sobre la base del análisis de datos de NGS. Las características demográficas y clínicas de la población cohorte se resumen en la Tabla 6.

	Total (n=44)
Edad (años), media \pm DS	49,9 \pm 15,1
< 45	16
45-65	20
>65	8
Sexo (Mujer/Hombre)	20/24
Tabaquismo	14 (31,8%)
Hipertensión arterial	12 (27,2%)
Diabetes mellitus	7 (15,9%)
Dislipemia	7 (15,9%)
Artritis psoriásica	11 (25%)
Tratamiento (Biológico/Sistémico convencional)	33/11

Tabla 6: Características demográficas y clínicas de la cohorte de 44 pacientes. DS: Desviación estándar.

Se detectó una mayor expresión de miR-133a en fumadores en comparación con pacientes no fumadores (valor de $p = 0,05$, coeficiente $\beta = 0,42$). En cuanto al género, solo la expresión de miR-133a mostró diferencias entre mujeres y hombres, siendo la expresión de este microARN mayor en este último grupo (valor de $p = 0,03$, coeficiente $\beta = 0,45$). Nuestros resultados mostraron que la edad era una variable demográfica que afectaba a la expresión de microARN: se detectaron niveles más altos de miR-142 (valor de $p = 0,043$, coeficiente $\beta = 0,412$) y miR-378a (valor de $p = 0,034$, coeficiente $\beta = 0,470$) en aquellos pacientes mayores de 45 años, mientras que la expresión de miR-135b se redujo en los pacientes mayores (valor de $p = 0,043$, coeficiente $\beta = -0,528$).

Por otro lado, no detectamos diferencias en la expresión de microARNs asociadas con la presencia de artritis psoriásica (APs). La presencia de dislipemia se asoció con niveles más altos de miR-375 (valor de $p = 0,001$, coeficiente $\beta = 1,224$) y niveles más bajos de miR-146a (valor de $p = 0,038$, coeficiente $\beta = -0,969$) y miR-3145 (valor de $p = 0,027$, coeficiente $\beta = -1,194$). También se observaron diferencias en miR-146a (valor de $p = 0,010$, coeficiente $\beta = 1,020$) y miR-375 (valor de $p = 0,001$, coeficiente $\beta = -1,110$) en diabetes mellitus. Por último, se detectaron niveles más bajos de miR-135b (valor de $p < 10^{-3}$, coeficiente $\beta = -0,703$, $p < 10^{-3}$) en aquellos pacientes con hipertensión arterial (Figura 14). Finalmente, se excluyeron miR-615 y miR-934 al presentar una expresión indetectable.

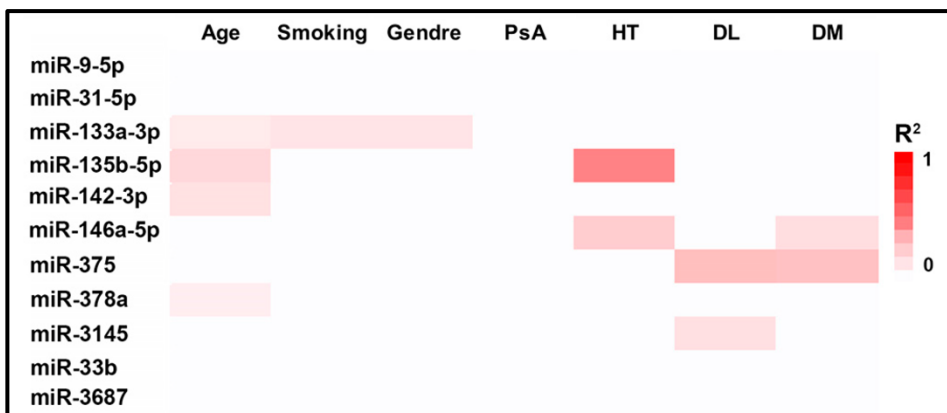


Figura 14: Efecto de las variables demográficas y clínicas en la expresión de microARNs. Datos analizados mediante modelo lineal generalizado (GLM). Sólo se muestran resultados significativos ($p < 0,05$). PsA: Artritis psoriásica, HT: Hipertensión arterial, DL: Dislipemia, DM: Diabetes mellitus.

5.3.3. Expresión diferencial de microARNs y su modificación después del tratamiento.

Nuestros resultados mostraron que la piel con lesión psoriásica expresaba niveles más bajos de miR-9-5p, miR-133a-3p y miR-375 en comparación con la piel no lesional (valor de $p < 0,05$) (Figura 15a). Por el contrario, se detectaron niveles más altos de miR-135b-5p, miR-378a, miR-142-3p, miR-146a-5p y miR-31 en piel lesional (Figura 15b). En la Figura 15c se muestra un mapa de calor del agrupamiento jerárquico de muestras de piel basado en la expresión de los microARNs validados.

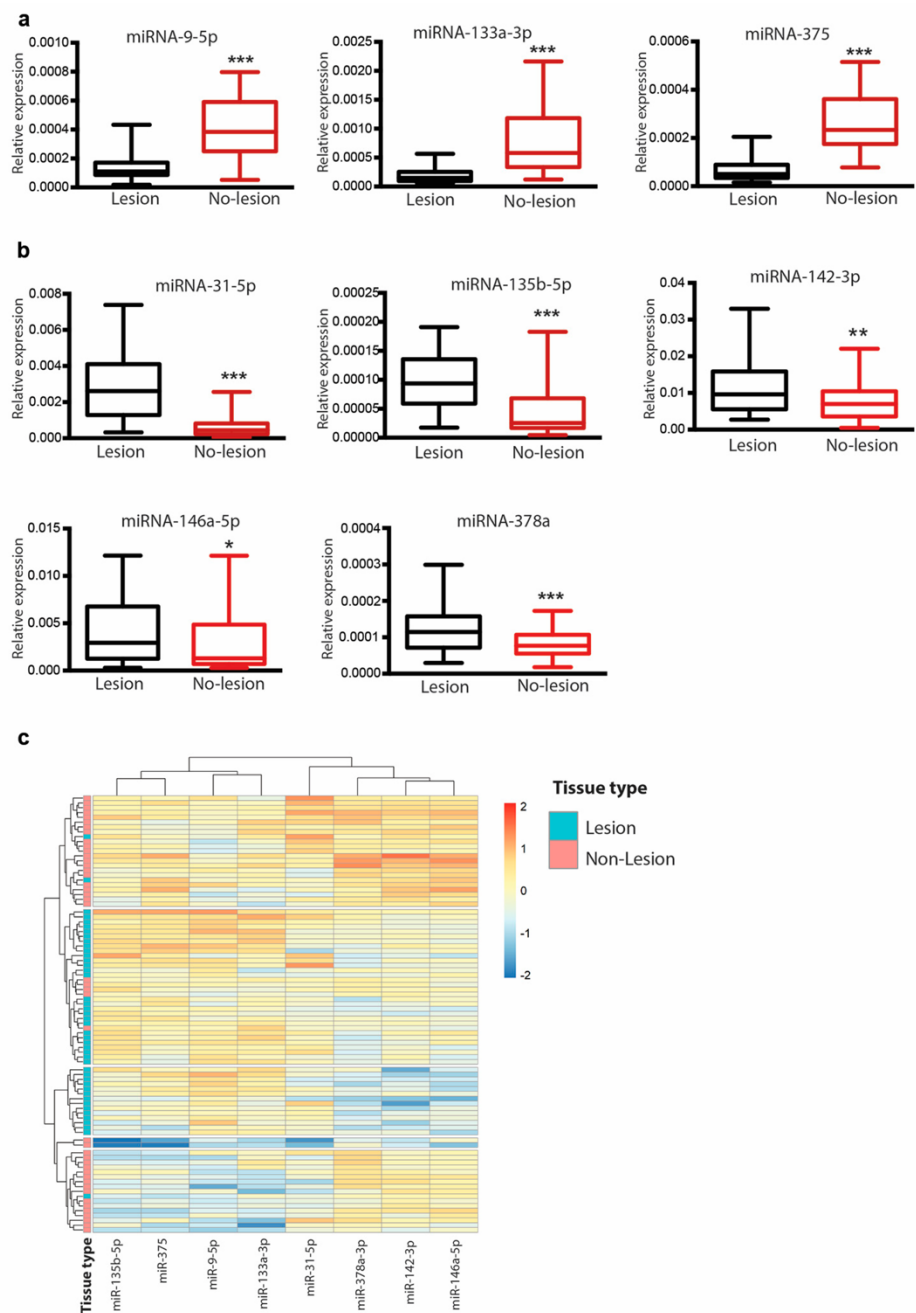


Figura 15: Análisis cuantitativo por PCR de microARNs en piel psoriásica lesional y no lesional. (a) Expresión diferencial de miR-9-5p,

*miR-133a-3p y miR-375 en piel lesional y no lesional de los 44 pacientes con psoriasis. (b) Expresión diferencial de miR-31-5p, miR-135b-5p, miR-142,3p, miR-146a-5p y miR-378a en piel lesional y no lesional de los 44 pacientes con psoriasis. Los datos corresponden a los niveles relativos de los microARNs indicados con respecto a la media geométrica del ARN ribosómico 5S y RNU1A1. Los datos se analizaron mediante la prueba de T pareada. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,000$. (c) Mapa de calor del agrupamiento jerárquico de muestras de piel basado en la expresión de microARNs validados (a y b).*

No se observaron diferencias significativas para miR-3145, miR-3687 y miR-33b.

A continuación, dirigimos el estudio a conocer si la expresión de estos microARNs se modificaba después del tratamiento. Para comprobarlo, comparamos la expresión de microARNs en piel psoriásica lesional frente a piel en zonas con lesión residual en 15 pacientes tratados con terapia biológica. El PASI de los pacientes a los 3 meses de tratamiento se muestra en la Tabla 7. En ese momento del tratamiento, cuando la inflamación local había disminuido significativamente como lo demuestra la expresión de IL-12b y S100A9 en las lesiones residuales (Figura 16), la expresión de miR-375 y miR-133a-3p aumentó mientras que la expresión de miR-378a y miR-135b disminuyó, volviendo así a niveles similares a los detectados en piel no lesional (valor de $p < 0,05$) (Figura 17a).

PASI	anti-IL-17	anti-IL-12/IL-23	anti-TNF-a	Total
50	0	2	0	2
75	0	0	1	1
90	2	5	0	7
100	1	1	3	5

Tabla 7: PASI tras tres meses de tratamiento con terapia biológica en los pacientes con segunda biopsia (n = 15). Se muestra el número total de pacientes por grupo. PASI: Índice de Severidad y Área de Psoriasis, IL: Interleuquina, TNF: Factor de necrosis tumoral.

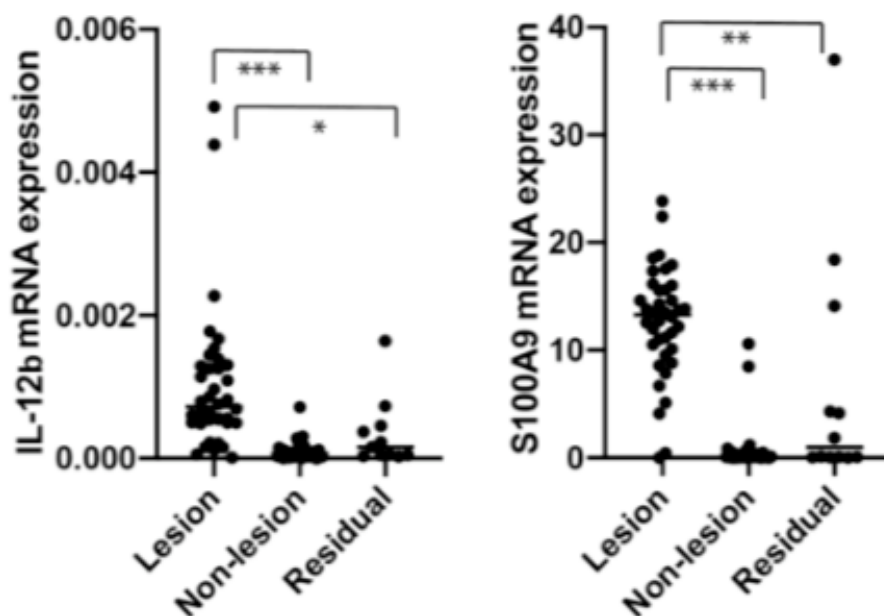


Figura 16: Expresión de IL-12b y S100A9 en muestras de piel como marcadores inflamatorios. Expresión de ARNm de IL-12b y S100A9 en

muestras de piel de pacientes psoriásicos (lesión, no lesión y lesión residual). Los datos corresponden a los niveles relativos con respecto a la expresión de GAPDH (Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa).

Por el contrario, no se detectaron diferencias en la expresión de miR-31, miR-146a, miR-142 y miR-9-5p entre piel lesional y las lesiones residuales (Figura 17b). Curiosamente, la disminución en la expresión de miR-135b se asoció significativamente con las tasas de mejora de los pacientes de acuerdo con el PASI, como lo indica la correlación de la mejoría de la enfermedad después de tres meses de tratamiento con la expresión de miR-135b en las lesiones residuales (Spearman $r = -0,6$ y valor $p = 0,02$) (Figura 18). Además, los niveles de miR-135b en lesiones residuales se asociaron claramente con la expresión de S100A9, como indicador de inflamación (r de Spearman = 0,86, valor de $p = 0,0006$) (Figura 19).

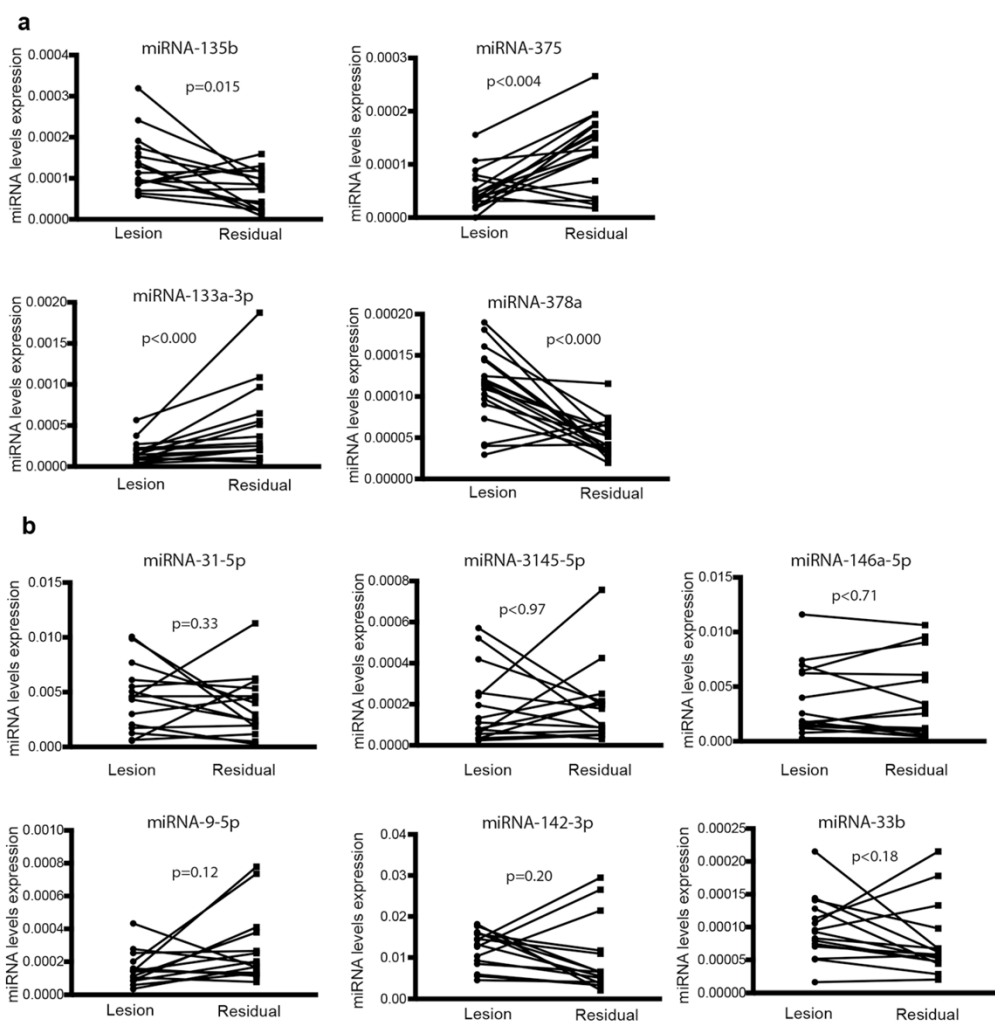


Figura 17: Niveles de microARNs en piel lesional antes del inicio del tratamiento y en lesiones residuales después de 3 meses de tratamiento. (a) Expresión de miR-135b-5p, miR-133a-3p, miR-375 y miR-78a en piel lesional antes del inicio del tratamiento y en lesiones residuales después de 3 meses de terapia biológica (n = 15). (b) Expresión de miR-31-5p, miR-3145-5p, miR-146a-5p, miR-9-5p, miR-142-3p y miR-33b en piel lesional antes del inicio del tratamiento y en

lesiones residuales después de 3 meses de terapia biológica (n = 15). Las líneas indican lesiones coincidentes y lesiones residuales del mismo paciente. Los resultados corresponden a la expresión relativa respecto a la media geométrica de la expresión 5S y RNU1A1. Los datos se analizaron mediante la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon.

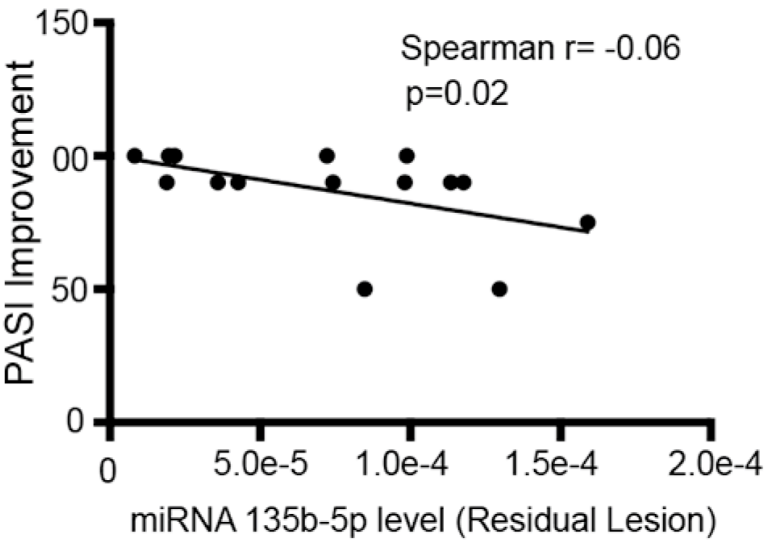


Figura 18: Relación entre miR-135b y la actividad de la enfermedad. Correlación entre los niveles de miR-135b en lesiones residuales y la mejoría de la enfermedad, valorada mediante PASI, después de 3 meses de tratamiento. Los datos se analizaron mediante la prueba de Spearman.

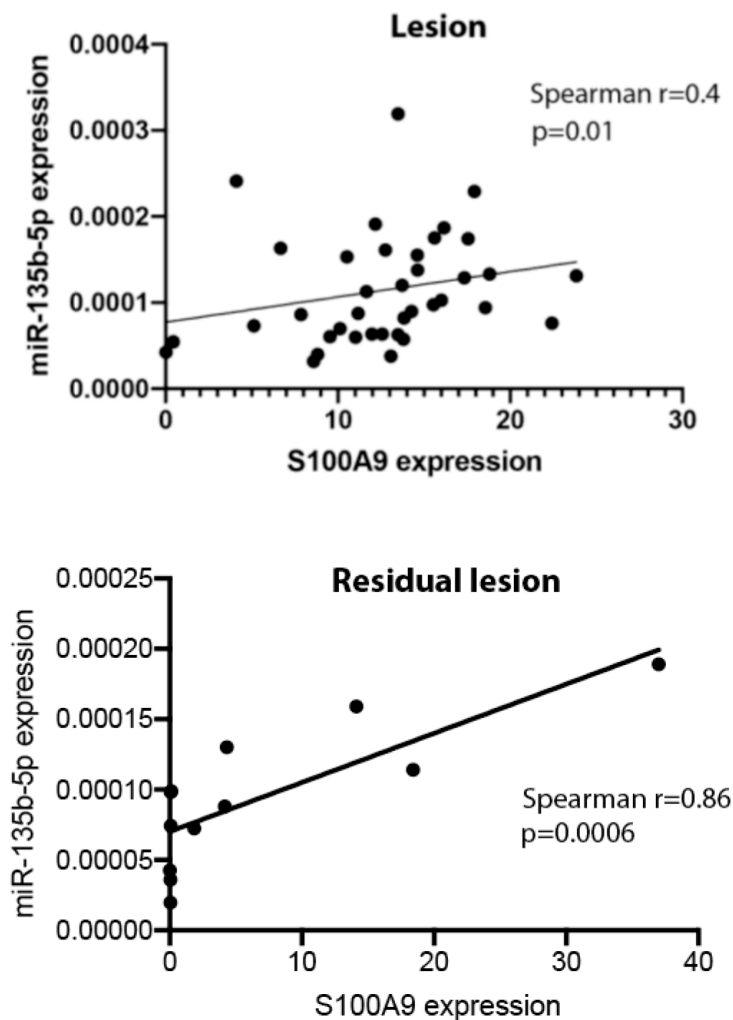


Figura 19: Relación entre miR-135b y S100A9. Correlación entre los niveles de miR-135b y S100A9 en lesiones de psoriasis y zonas de lesión residual. Los datos se analizaron mediante la prueba de Spearman.

5.3.4. Correlación entre la expresión de microARNs y variables clínicas/actividad de la psoriasis.

Al analizar la relación entre la expresión de microARNs en piel lesional o no lesional y la gravedad de la psoriasis, identificamos primero las variables clínicas y demográficas asociadas al PASI. El análisis estadístico reveló que la presencia de diabetes mellitus y los niveles basales de creatinina se asociaron con una actividad mayor de la enfermedad (valor $p = 0,073$, coeficiente $\beta = -7,193$ y valor $p = 0,070$, coeficiente $\beta = 16,280$, respectivamente). Posteriormente, se analizó la asociación entre expresión de microARNs y el PASI ajustando por el antecedente de diabetes y los niveles de creatinina. Entre los 12 microARNs analizados, sólo la expresión de miR-9-5p en piel lesional se asoció con los valores del PASI (valor $p = 0,005$, coeficiente $\beta = 7,35$) (Tabla 8).

	β Coefficient (95% CI)	p -Value
DM	-10.36 (-20.13—0.59)	0.039
* creatinine levels	21.49 (8.21–34.7)	0.003
** miRNA-9-5p	7.35 (2.44–12.25)	0.005

Tabla 8: Análisis de regresión múltiple para el PASI (Índice de área y severidad de la psoriasis). DM: Diabetes mellitus, *niveles basales de creatinina, **expresión en piel lesional.

5.3.5. Expresión basal de miR-146a y miR-135b y su asociación con la mejoría en la actividad de la enfermedad.

Para analizar la asociación entre los niveles de microARNs expresados antes del tratamiento y la mejoría de los pacientes, sólo se consideraron aquellos pacientes tratados con fármacos biológicos (n = 33). Catorce pacientes fueron tratados con anti-IL-12/IL23, 8 con anti-TNF α y 11 con anti-IL-17. Después de tres meses de tratamiento, 7 pacientes (21,2%) alcanzaron PASI 100, 18 pacientes (54,5%) PASI 90, 4 pacientes (12,1%) PASI 75, 3 pacientes (9%) PASI 50 y sólo 1 paciente (3%) mejoró un 25% desde el inicio. En primer lugar, analizamos si los factores de riesgo/comorbilidades clásicamente asociados a la psoriasis (edad, hipertensión, diabetes mellitus, tabaquismo y obesidad) [Kovitwanichkanont et al., 2020; Naldi et al., 2020] o el tipo de terapia biológica empleada se asociaban o no a la mejoría en nuestros pacientes. Se detectó una asociación significativa para la edad (valor p = 0,04) y se identificó una asociación marginal para el tipo de terapia biológica (valor p = 0,13) (Tabla 9). Ambas variables se incluyeron en un modelo multiparamétrico. El análisis estadístico mostró que la expresión de miR-146a en piel no lesional (OR = 2,33, valor de p = 0,015), miR-135b (OR = 6,06, valor de p = 0,009) en piel lesional y la edad (OR = 0,95, valor de p = 0,078) se relacionaron con la mejoría del PASI (Tabla 10).

	OR (95% CI)	p Value
Age	0.95 (0.91-1.99)	0.04
Smoking	2.2 (0.50-9.89)	0.29
BMI	0.98 (0.93-1.03)	0.49
Treatment		
* anti-IL12/IL23	0.29 (0.05-1.44)	0.131
anti-TNFa	0.53 (0.07-3.6)	0.521
DM	2.92 (0.51-16.1)	0.22
NL miRNA-146a	1.70 (0.94-3.06)	0.076
L miRNA-135b	3.49 (1.18-10.25)	0.023

Tabla 9: Regresión logística univariante aplicada a variables clínicas relevantes y mejoría clínica mediante PASI (Índice de Severidad y Área de Psoriasis). Se incluyen microARNs con asociación significativa ($p < 0,1$). OR: Odds ratio, CI: Intervalo de confianza, BMI: Índice de masa corporal, IL: Interleuquina, TNF: factor de necrosis tumoral, DM: Diabetes mellitus, NL: No lesional, L: Lesional, *tomando como referencia los valores asociados al tratamiento con anti-IL17.

	OR (95% CI)	p-Value
Treatment *		
anti-IL12/IL23	0.31 (0.05–1.88)	0.200
anti-TNFa	0.55 (0.08–3.83)	0.550
Age	0.95 (0.90–1.0)	0.078
NL miRNA-146a	2.33 (1.25–4.58)	0.015
L miRNA-135b	6.06 (1.57–23.33)	0.009

Tabla 10: Regresión logística multivariable respecto a mejoría clínica mediante PASI (Índice de Severidad y Área de Psoriasis) a los 3 meses

de tratamiento. Se consideraron todas las covariables con un valor de $p < 0,1$ en el análisis univariable (Tabla 9). OR: Odds ratio, CI: Intervalo de confianza, IL: Interleuquina, TNF: factor de necrosis tumoral, NL: No lesional, L: Lesional, *tomando como referencia los valores asociados al tratamiento con anti-IL17.

5.3.6. Asociación entre los genes diana de los microARNs y la psoriasis.

Con el objeto de obtener información sobre los procesos biológicos en los que podrían estar involucrados los genes diana de los microARNs alterados, se realizó un análisis de enriquecimiento mediante el programa IPA (Ingenuity Pathway Analysis, Qiagen, Hilden, Alemania). Los datos de expresión génica disponibles públicamente que comparan el perfil de expresión de muestras de piel lesional y no lesional de pacientes con psoriasis se descargaron de GEO (Gene Expression Omnibus, GSE67785). Las dianas de microARNs con interacciones se filtraron para mantener sólo aquellas con expresión anti-correlacionada (es decir, una alta expresión de microARN en la piel lesional y una menor expresión de su diana). La psoriasis se detectó entre las enfermedades significativamente asociadas, con un valor-p de 0,004 (0,069 tras el ajuste con el método de Benjamini-Hochberg). El análisis de IPA mostró 18 genes diana asociados con la psoriasis (Figura 20).

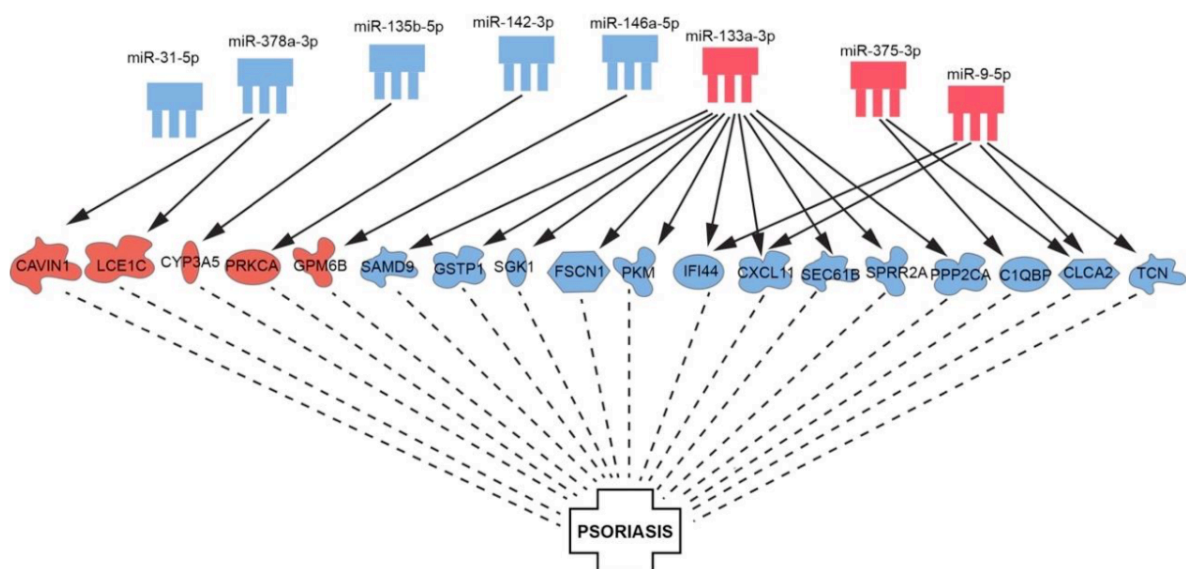


Figura 20: Red de interacción de microARNs y ARNm diana asociados con la psoriasis. Red que muestra las interacciones entre los microARNs expresados diferencialmente y los ARNm diana expresados diferencialmente y asociados con la psoriasis. Las interacciones se identificaron utilizando la herramienta IPA "MicroARN Target Filter" del Ingenuity Pathway Analysis de Qiagen. Los pares con interacciones fueron filtrados para conservar sólo aquellos con expresión anti-correlacionada. Sólo se incluyeron los ARNm diana observados experimentalmente o que respondían a predicciones de alta confianza. Las moléculas reguladas al alza se muestran en azul y las reguladas a la baja en rojo.

Dado que la revisión de la literatura no mostró vínculos directos de la mayoría de estos genes con la patogénesis de la psoriasis, utilizamos un enfoque adicional para identificar la asociación entre las dianas de estos microARNs y esta enfermedad. Las dianas funcionales de los microARNs se identificaron utilizando el software miRTarBase. Los genes se filtraron para mantener sólo aquellos con expresión anti-correlacionada y se sometieron al Sistema de Clasificación PANTHER para determinar la sobrerrepresentación de los procesos biológicos presentes en Gene Ontology. Con este enfoque, encontramos que las dianas genéticas descritas presentaban un enriquecimiento en procesos relacionados con la respuesta inmune y la angiogénesis (Figura 21).

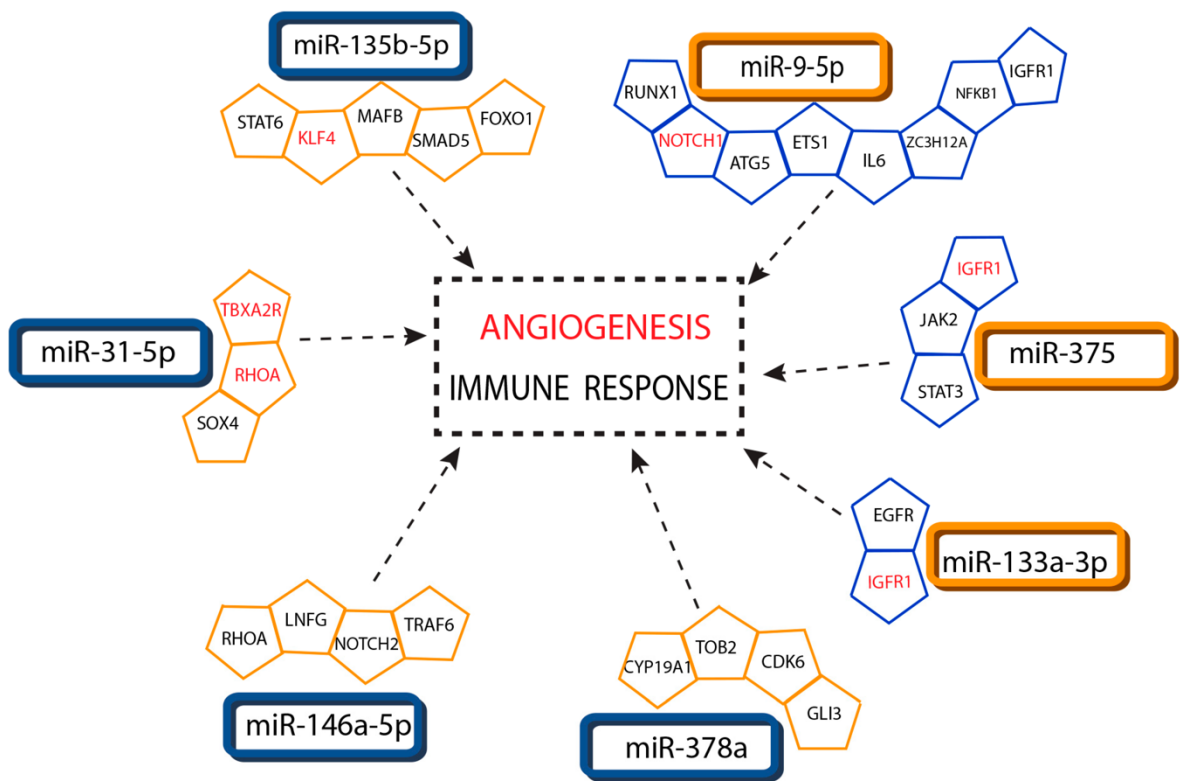


Figura 21: Red de interacción de microARNs y ARNm diana asociados con la respuesta inmune y la angiogénesis. Redes que muestran las interacciones entre los microARNs y las dianas de ARNm expresados diferencialmente y asociados con procesos de respuesta inmune y angiogénesis (identificados en rojo). Las interacciones se identificaron utilizando miRTarBase y se sometieron al análisis del sistema PANTHER. Los pares con interacciones se filtraron para mantener sólo aquellos con expresión anti-correlacionada. Sólo se muestran las dianas con soporte funcional. Las moléculas reguladas al alza se muestran en azul y las reguladas a la baja en naranja.

6. Estudio 2: Perfiles de microARNs en suero para evaluar el riesgo potencial y la gravedad de la psoriasis y otras enfermedades inflamatorias mediadas por la respuesta inmune (IMIDs).

6.1. Objetivos específicos:

- I. Determinar la expresión en suero de microARNs circulantes en pacientes con psoriasis y otras IMIDs, así como en controles sanos.
- II. Estudiar la función de los microARNs circulantes como biomarcadores predictores del desarrollo de estas enfermedades.
- III. Definir la utilidad de estos microARNs circulantes como biomarcadores predictores de gravedad en estos pacientes.
- IV. Evaluar la influencia de factores demográficos y clínicos en la expresión en suero de los microARNs a estudio.

6.2. Material y métodos.

6.2.1. Pacientes y recogida de muestras.

El proyecto BIOIMID fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital de la Princesa (CEIm Hospital Universitario La Princesa, PI-734) y se obtuvo el consentimiento informado por escrito de todos los pacientes antes de su inclusión, de acuerdo con la Declaración de Helsinki.

Se estudiaron un total de 78 sujetos: 20 sujetos sanos, 20 (9 mujeres) pacientes con diagnóstico de psoriasis, 19 pacientes (18 mujeres) diagnosticados de enfermedad de Graves (EG) con o sin oftalmopatía de Graves (OG) definida por los criterios del EUGOGO (European Group on Graves Ophthalmopathy) [Bartalena et al., 2016] y 19 pacientes (14 mujeres) diagnosticados de artritis reumatoide (AR) según los criterios de 2010 EULAR/ACR (European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology) [Aletaha et al., 2010]. Las principales características clínicas de los pacientes y de los controles se muestran en las Tablas 11 y 12.

	Leve	Grave	Controles	p
n	27	31	20	-
Sexo (M/H)	20/7	21/10	9/9	0,1015
Edad (años)	51,9 (34,2-64,3)	49,66 (35-61,3)	44,5 (27,7-56,7)	0,4681
Duración de la enfermedad (meses)	2,4 (0,4-97,2)	72 (2,6-174)	NA	0,0698
Fumadores (Sí/No/Ex)	8/13/6	8/19/4	5/12/1	0,953
BMI	26,1 (23,92-28,4)	25,56 (21,72-31,05)	27,2 (22,2-29,7)	0,9481

Tabla 11: Características clínicas de los pacientes con IMIDs (enfermedades inflamatorias mediadas por la respuesta inmune) clasificados por gravedad y de los controles. Los valores muestran el número para los valores categóricos y la mediana (intervalos intercuartílicos) para las variables continuas. BMI: Índice de masa corporal.

	Psoriasis		EG		AR	
	Leve	Grave	Leve	Grave	Leve	Grave
Sexo (M/H)	6/3	3/8	9/0	9/1	5/4	9/1
Edad (años)	53 (42-68,5)	40 (32-45,5)	51 (40-73)	50 (33-58)	52,8 (34,3- 54,1)	49,9 (34-62,1)
Duración de la enfermedad (meses)	84 (0-156)	132 (96-198)	1,57 (0,86- 4,1)	2,6 (0,3-5)	8 (3,9-16,9)	4,2 (3,1-6,3)
Fumadores (Sí/No/Ex)	2/6/1	5/3/3	2/6/1	4/5/1	4/1/4	0/7/3
BMI	27,5 (22,5-31,7)	26,5 (22,2-30,4)	24,5 (21,4-25,9)	21,9 (20,2-27,6)	26,1 (24,3-28,1)	29,4 (25,6-32,8)
PASI	8,4 (6,2-9)	22,5 (16,45-35)	-	-	-	-
Oftalmopatía	-	-	0	10	-	-
TSH mU/mL	-	-	0 (0-9,2)	0 (0-7,2)	-	-
T4 ng/dL	-	-	2,03 (0,47-4,8)	1,54 (0,56-4,7)	-	-
Tg-Ab UI/mL	-	-	20 (20-1076)	133 (20-1292)	-	-
TPO-Ab UI/mL	-	-	20 (20-565,5)	421 (20-2409)	-	-
TSHR-Ab U/L	-	-	1,81 (1,38-3,24)	3,9 (2,94-6,12)	-	-
DAS28	-	-	-	-	2,1 (1,7-2,4)	6,2 (5,5-6,9)
HAQ	-	-	-	-	0,4 (0,1-0,5)	1,6 (1,1-1,9)
FR UI/mL	-	-	-	-	102 (25-188)	34 (27-101)
CCP 50 UI/mL	-	-	-	-	1472 (406-2070)	390,5 (327-498)

Tabla 12: Características clínicas de los pacientes con IMIDs

(enfermedades inflamatorias mediadas por la respuesta inmune) clasificados por gravedad. Los valores muestran el número para los valores categóricos y la mediana (25 a 75 intervalos intercuartílicos) para las variables continuas. EG: enfermedad de Graves, AR: artritis reumatoide, BMI: Índice de masa corporal, PASI: Índice de Severidad y Área de Psoriasis, TSH: tirotropina (rango normal = 0,27–4,20), T4: tiroxina (rango normal = 0,93 a 1,7), Tg-Ab: anticuerpo anti-tiroglobulina (negativo < 344), TPO-Ab: anticuerpo anti-peroxidasa tiroidea (negativo < 100), TSHR-Ab: anticuerpo anti-receptor de tirotropina (negativo < 0,7). DAS28: escala de actividad de enfermedad de 28 articulaciones, HAQ: puntuación del Health Assessment Questionnaire (versión en español) [Esteve-Vives et al., 1993], FR: factor reumatoide (evaluado por nefelometría, positivo > 20 UI/mL), CCP: anticuerpo anti-péptido citrulinado (medido por inmunoensayo enzimático -EIA-: Immunoscan RA, Euro-Diagnostica, positivo > 50 UI/mL).

Los pacientes se clasificaron como afectados por enfermedad leve o grave según los siguientes parámetros en cada grupo:

A) En el grupo de psoriasis, la gravedad se evaluó mediante el índice de severidad y área de psoriasis (PASI): 9 pacientes con PASI < 10 se clasificaron como con enfermedad leve y 11 pacientes con PASI ≥ 10 como con enfermedad grave.

B) En el grupo de EG, se utilizó un valor de corte de 3 sobre los 7 puntos de la escala de actividad clínica (CAS) para diagnosticar la EG activa [Bartalena et al., 2016]. Un total de 9 pacientes tenían enfermedad leve y 10 pacientes tenían enfermedad grave con una OG activa.

C) En el grupo de AR, se utilizó la escala de actividad de enfermedad de 28 articulaciones (DAS28) para evaluar la gravedad [Prevoo et al., 1995]. Se clasificó a 9 pacientes con enfermedad leve ($DAS28 < 2,6$) y 10 con enfermedad grave ($DAS28 > 5,1$).

Se recolectaron muestras de sangre antes de la prescripción del tratamiento. El suero se obtuvo mediante centrifugación de 10 minutos ($1500 \times g$) de 10 ml de sangre total y se almacenó a -80°C hasta su uso en el Biobanco del Instituto de Investigación Sanitaria Princesa.

6.2.2. Extracción de ARN y RT-PCR.

Para probar la hemólisis en las muestras de suero, se midió la absorbancia de hemoglobina libre a 414 nm usando un espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 (Thermo Scientific). Se descartaron las muestras con un pico $> 0,2$. El ARN se purificó a partir de muestras de suero de 200 μl utilizando miRCURY RNA Isolation Kit Biofluids (Exiqon), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se añadió una solución de lisis que contenía 1,25 $\mu\text{g/ml}$ de ARN de bacteriófago MS2 (Roche Diagnostics) y se añadieron las plantillas de

ARN: UniSp2, UniSp4 y UniSp5 a los 200 µl de suero. El ARN se purificó en minicolumnas de microARNs y se almacenó a -80°C. La solidez del proceso de aislamiento de ARN se evaluó empleando paneles de control de calidad de microARNs miRCURY (Exiqon). Se generó ADNc de primera hebra usando el kit de síntesis de ADNc (Exiqon) y la posterior RT-PCR se realizó por triplicado usando conjuntos de cebadores de PCR microARN LNA™ (Exiqon). La PCR se llevó a cabo en placas de 384 pocillos en un CFX384 Real-Time System (Roche). Las muestras de todos los grupos se procesaron al mismo tiempo.

6.2.3. Análisis de la RT-PCR.

Basándonos en su papel en la respuesta inmune o en su expresión alterada en enfermedades autoinmunes, seleccionamos un grupo de microARNs con un potencial valor predictivo en la evaluación de la gravedad de las IMIDs, que incluían: miR-10a, miR-19a-3p, miR-19b-3p, miR-21-5p, miR-23a-3p, miR-26b-5p, miR-27a-3p, miR-29a-3p, miR-93-3p, miR-101-3p, miR-125b-5p, miR-126-3p, miR-127-3p, miR-142-3p, miR-143-3p, miR-146a-5p, miR-150-5p, miR-155-5p, miR-191-5p, miR-210-3p, miR-326 y miR-451 (Tabla Suplementaria 5).

Además, miR-103a-3p y miR-30c-5p se incluyeron como posibles normalizadores [Peltier 2008]. Las Cantidades Relativas (CR) se determinaron utilizando los valores log base 2 de la diferencia en el

umbral del ciclo (Ct) entre los microARNs y la expresión de un control interno de extracción, el UniSp2. A continuación, los valores de las CR se normalizaron utilizando el valor de la expresión miR-103a. La identificación de miR-103a como el microARN de referencia más estable se realizó de acuerdo con publicaciones previas [Marabita et al., 2016]. La puntuación de estabilidad (SSS) se calculó para varios microARNs (Tabla 13) mediante la combinación de diferentes algoritmos, incluidos geNorm [Vandesompele et al., 2002], Normfinder [Andersen et al., 2004] y coeficiente de variación [Marabita et al., 2016]. Independientemente de los grupos, la expresión de miR-10a, miR-127, miR-155 y miR-326 en suero fue muy baja o incluso indetectable (Ct > 40, Figura 22).

microARNs	SSS
miR-103c	0.911244038
miR-191c	1.048962897
miR-30c	1.076632789
miR-23a	1.148989965
miR-19a	1.216353472
miR-21	1.22729712
miR-126	1.399276771
miR-142	1.629945657
miR-19b	1.692868012
miR-150	1.775707256
Correlación geNorm vs. NormFinder = 0.657	
Correlación Coeficiente de variación vs. NormFinder = 0.405	
Correlación geNorm vs. Coeficiente de variación = 0.155	

Tabla 13: Resumen de las puntuaciones de estabilidad (SSS) de los microARNs clasificados en orden ascendente según su variabilidad (una SSS más baja significa una mayor estabilidad). La SSS se generó utilizando tres métodos de normalización: geNorm [Vandesompele et al., 2002], NormFinder [Andersen et al., 2004] y la puntuación del coeficiente de variación descrita por Marabita [Marabita et al., 2016].

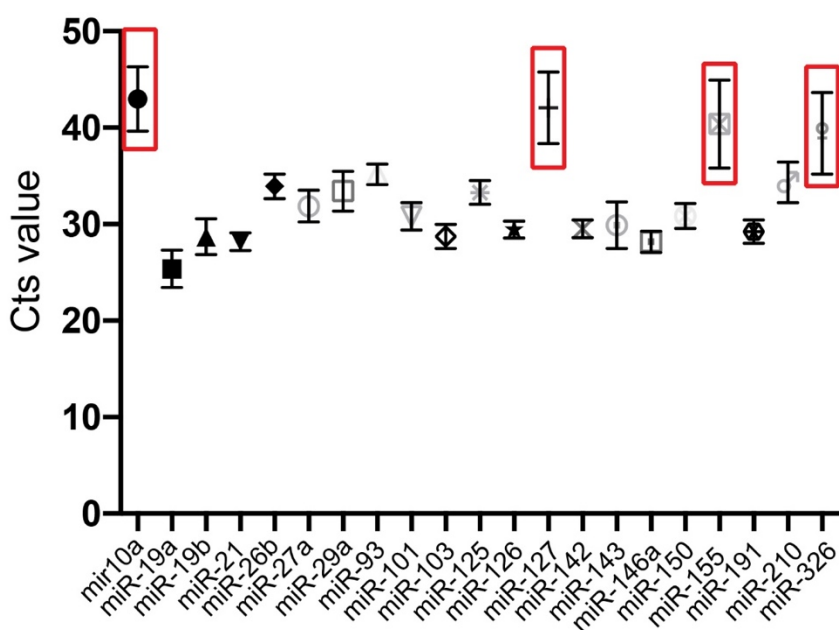


Figura 22: Valores de Ct (umbral de ciclo) de los microARNs analizados en muestras de suero. Se obtuvo ARN a partir de 200 μ l de suero ($n = 79$) de pacientes con IMIDs (enfermedades inflamatorias mediadas por la respuesta inmune) y controles y se utilizaron 4 μ l de ARN para la síntesis de ADNc. La PCR en tiempo real (45 ciclos) se realizó por triplicado en el dispositivo BioRad CFX384. Los pocillos con Ct = 45 se consideraron no amplificados y los microARNs correspondientes se excluyeron del estudio. MiR-10a, miR-127, miR-155 y miR-326 (recuadros rojos) se excluyeron del análisis. Los valores de Ct se representan como media \pm desviación estándar.

6.2.4. Análisis estadístico.

Los resultados descriptivos se expresaron como media \pm desviación estándar (DS), media \pm error estándar de la media (SEM) o mediana y percentil 25-75, según correspondía. Se realizaron correlaciones bivariadas de Pearson para todas las variables cuantitativas. Las diferencias entre los grupos se compararon utilizando Chi-Cuadrado, prueba T de Student o análisis de varianza (ANOVA), según fuera apropiado. Se aplicó una transformación de variable a los valores de expresión de microARNs para lograr una distribución normal con el fin de aplicar pruebas paramétricas.

Se realizó un análisis de matriz de correlación de Pearson entre todos los microARNs estudiados y los coeficientes de correlación por pares resultantes se representaron como un mapa de calor para la evaluación visual. Los valores de correlación se agruparon jerárquicamente siguiendo las distancias euclidianas entre los objetos y el enlace completo utilizando el paquete de recalentamiento en la versión R 3.5.1 [Barter et al., 2018]. Las diferencias para cada microARN normalizado entre los controles y los grupos de IMIDs se compararon mediante un modelo de regresión logística, ajustado por edad y sexo, como se recomienda en publicaciones previas [Ameling et al., 2015]. Los valores de corte óptimos de expresión de microARNs para determinar los grupos de bajo y alto riesgo se evaluaron utilizando el paquete maxstat R [Hothorn et al., 2003]. Finalmente, se realizó un análisis de curvas ROC para evaluar el poder de clasificación

de cada modelo de regresión logística, ajustado para la predicción de IMIDs o la gravedad de la enfermedad utilizando el paquete pROC en la versión R 3.5.1 [Robin et al., 2011]. Los valores de p fueron bilaterales y se consideró significación estadística cuando $p < 0,05$. Los datos se presentan con los valores p específicos: $p < 0,05$, $p < 0,01$ y $p < 0,001$. Los diagramas de caja se representaron utilizando el software GraphPad Prism 4.

6.3. Resultados.

6.3.1. Características clínicas de los pacientes con IMIDs.

Para identificar microARNs circulantes comunes o específicos para las diferentes IMIDs, se realizó un análisis de expresión mediante ensayos de RT-PCR en muestras de suero de pacientes con psoriasis ($n = 20$), EG ($n = 19$) y AR ($n = 19$), y de sujetos control ($n = 20$). Las características clínicas y demográficas de los pacientes se muestran en las Tablas 11 y 12. Un total de 27 pacientes tenían IMIDs leves mientras que 31 tenían una enfermedad grave. En cuanto a las diferencias demográficas, el número de mujeres fue mayor en el grupo de IMIDs, probablemente debido a la mayor susceptibilidad de las mujeres a estas enfermedades, mientras que no se detectaron diferencias de edad entre los pacientes con IMID leve (51,9 años, 34,2-64,3), IMID grave (49,66, 35-61,3) y controles (44,5, 27,7-56,7). La duración de la

enfermedad fue ligeramente mayor en el grupo de afectación grave, aunque la diferencia no alcanzó significación estadística. Los antecedentes de tabaquismo y el índice de masa corporal (BMI) también fueron similares entre los grupos. Se analizó la influencia de las variables clínicas y demográficas en los niveles de expresión de microARNs en el grupo control, encontrando que 6 microARNs diferentes se asociaron significativamente con la edad y el sexo, mientras que no hubo asociación significativa entre ninguno de los microARNs analizados y el BMI (Figura 23). Por ello, los análisis posteriores se ajustaron por sexo y edad como también se había publicado anteriormente [Ameling et al., 2015].

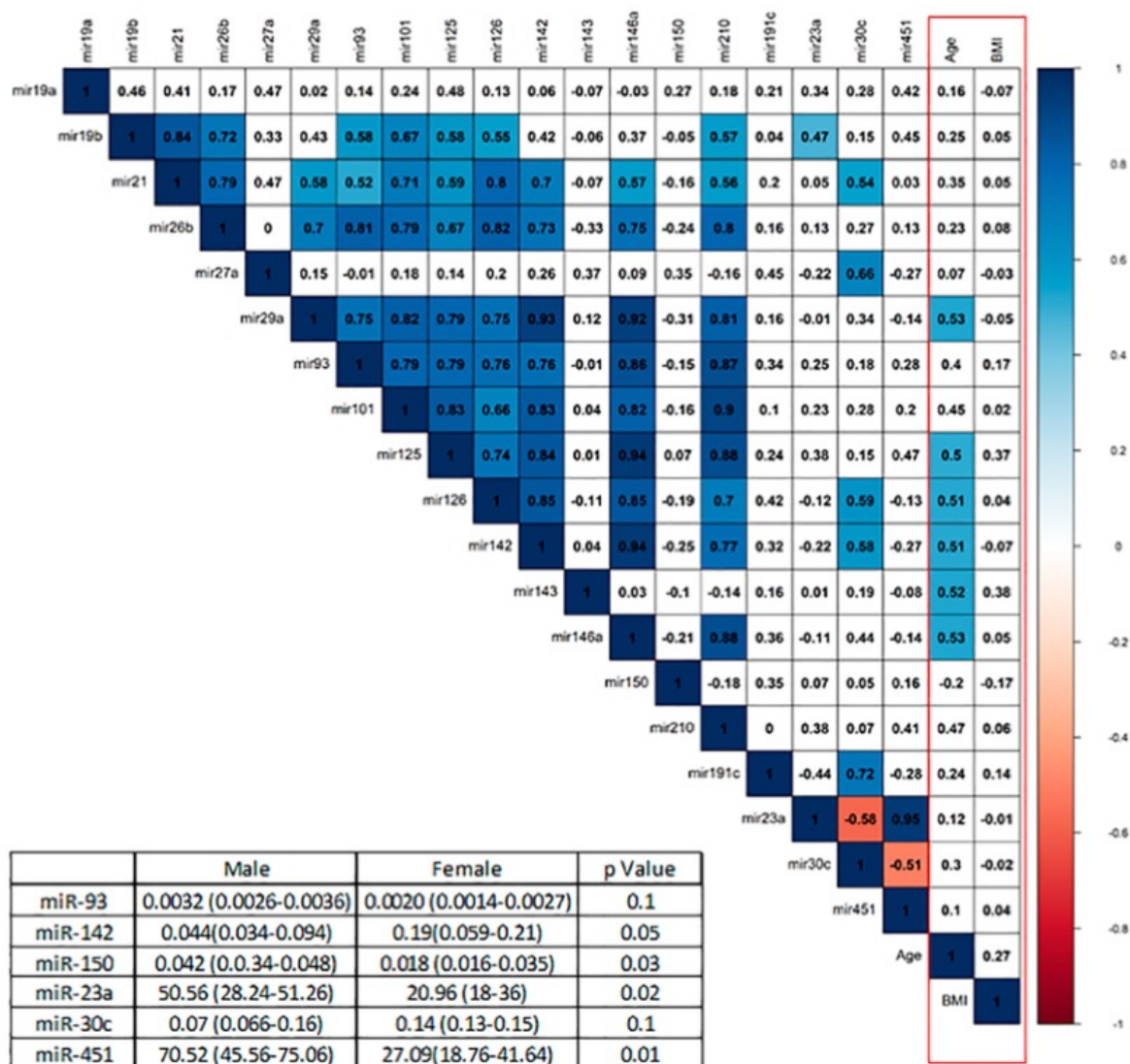


Figura 23: Asociación entre niveles séricos de microARNs y variables clínicas y demográficas en controles sanos. Mapa de calor de correlación entre microARNs, edad e índice de masa corporal (BMI) en las muestras de los sujetos control. MiR-29a, miR-125, miR-126, miR142, miR-143 y miR-146a se asociaron significativamente con la

edad. En la tabla se muestran las diferencias asociadas al sexo en los niveles de microARNs NRQ. Los valores representan el coeficiente de correlación de rango de Spearman, ρ (ρ). Las correlaciones positivas significativas se presentan en azul y las correlaciones negativas en rojo. La intensidad del color aumenta con la magnitud de la correlación. Las celdas de color blanco indican coeficientes de correlación no significativos.

6.3.2. Expresión de microARNs en pacientes con IMIDs.

Para identificar grupos potenciales de microARNs en muestras de suero en función de su perfil de expresión molecular, se llevó a cabo un análisis de matriz de correlación de Pearson entre cantidades relativas normalizadas de microARN. El agrupamiento jerárquico no supervisado (*Unsupervised hierarchical clustering*) mostró dos grupos principales de microARNs que se comportaban de manera diferente, según la correlación de sus perfiles de expresión. El grupo A incluyó microARNs con correlaciones positivas homogéneas, que podrían dividirse en tres subgrupos: A1 (miR-101, miR-19a, miR-23a y miR-451), A2 (miR-29a, miR-125 y miR-210) y A3 (miR-150, miR-27a y miR-143) (Figura 24).

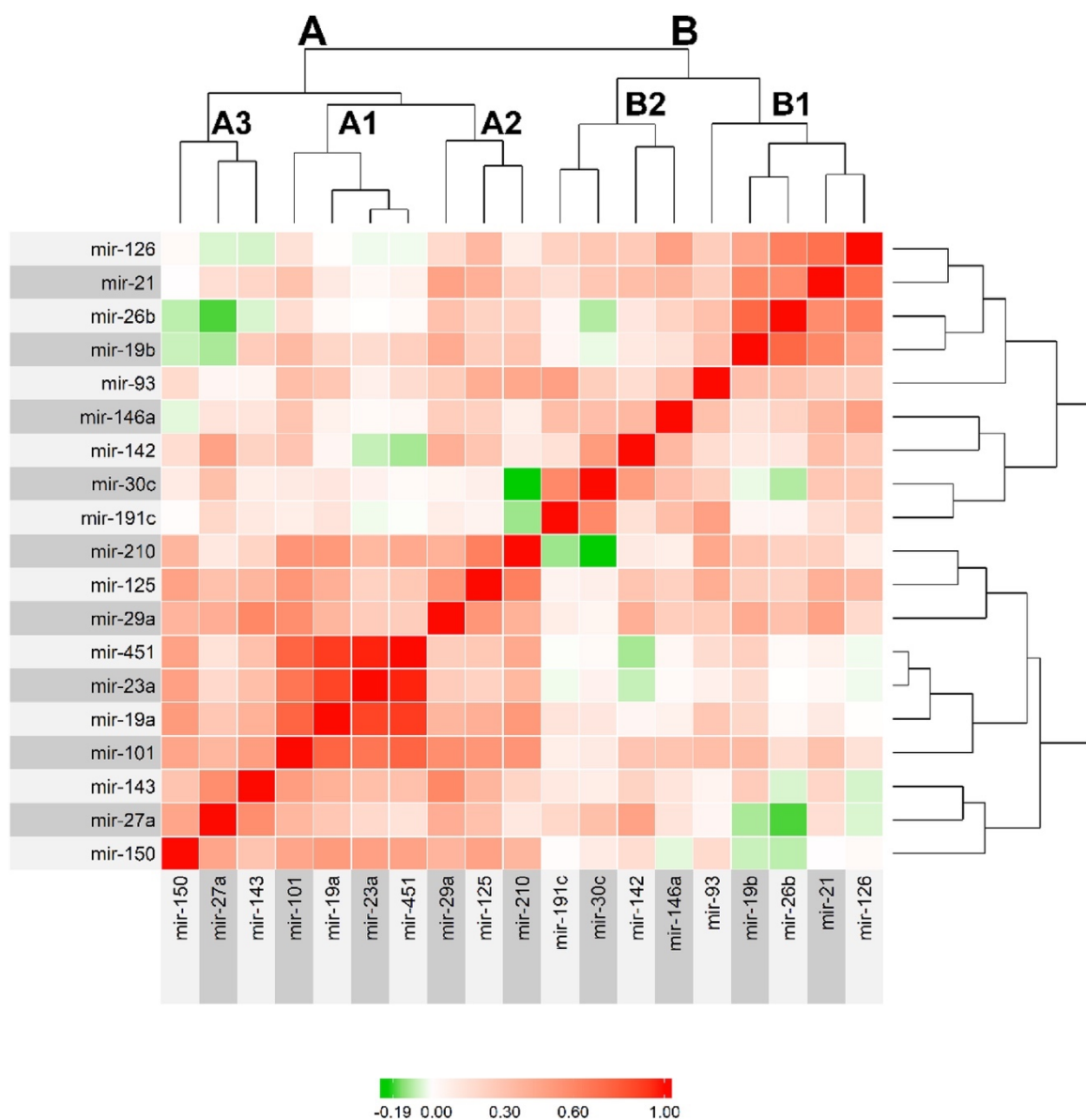


Figura 24: Mapa de correlación entre microARNs en IMIDs (enfermedades inflamatorias mediadas por la respuesta inmune). Representación gráfica de la matriz de correlación de Pearson entre

cantidades relativas normalizadas de diferentes microARNs en muestras de suero de pacientes con IMIDs. Los valores del coeficiente de correlación (ρ) ordenados por agrupamiento jerárquico están representados por una escala de colores que va desde $-0,19$ (correlación negativa, verde) a 1 (correlación positiva, rojo). La matriz de correlación revela dos grupos diferentes de microARNs (A y B).

El grupo B mostró correlaciones de expresión heterogéneas y podría dividirse en 2 subgrupos: B1 (miR-93, miR-19b, miR-26b, miR-21 y miR-126) y B2 (miR-191, miR-30c, miR-142 y miR-146a) (Figura 24). Estos diferentes perfiles de expresión sugieren que pueden existir amplios puntos en común globales entre grupos de microARNs relacionados con su regulación postranscripcional en IMIDs. Curiosamente, el grupo A tendió a mostrar correlaciones de expresión negativa o nula con los microARNs del grupo B.

Para determinar si estos diferentes perfiles de expresión tenían una relevancia funcional, primero analizamos la expresión diferencial de microARNs entre pacientes con IMIDs y sujetos sanos. Nuestros datos mostraron que sólo la expresión de los miembros del subgrupo B1 miR-19b y miR-26b disminuyó significativamente ($p < 0,001$) en el grupo de IMIDs en comparación con el grupo de control (Figura 25 y Tabla 14). Los mejores puntos de corte de NRQ (cantidad relativa normalizada)

para la discriminación de IMIDs fueron 0,356 para miR-19b ($p = 0,0001$) y 0,0091 para miR-26b ($p = 0,0008$).

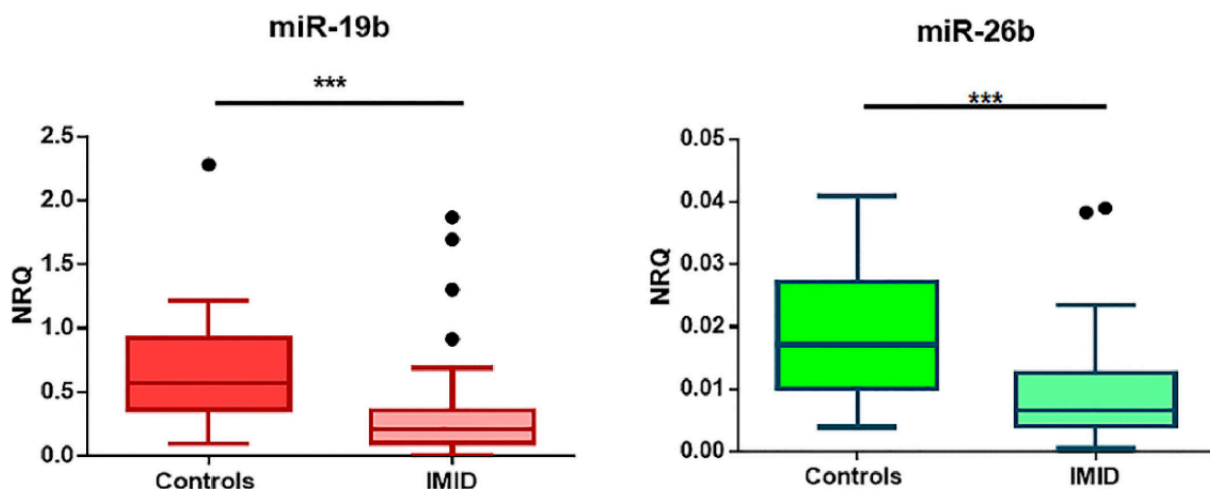


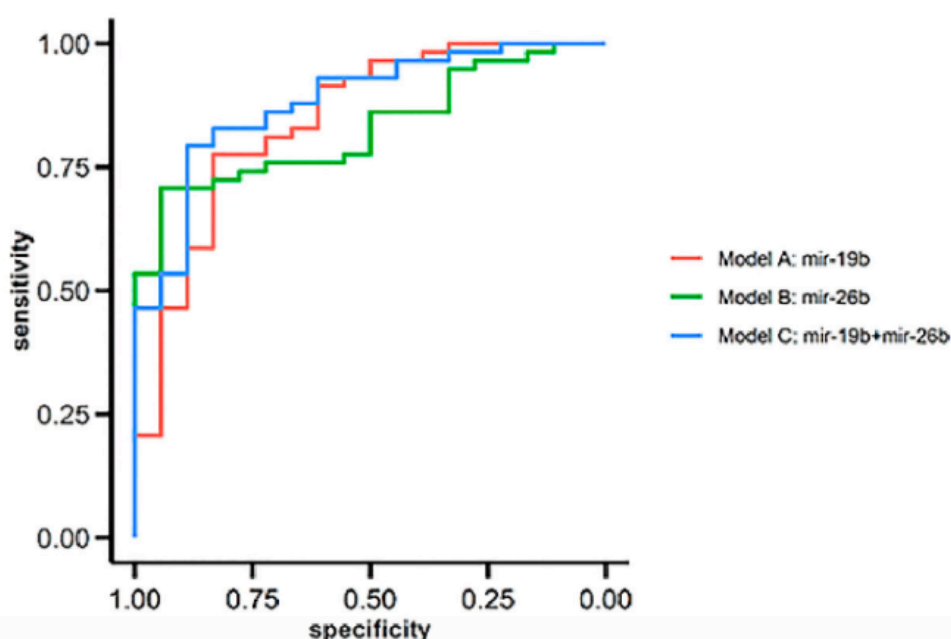
Figura 25: MicroARNs séricos asociados con IMIDs (enfermedades inflamatorias mediadas por la respuesta inmune) [1]. Expresión en NRQ (cantidad relativa normalizada) de microARNs estadísticamente significativa en muestras de suero de pacientes con IMIDs en comparación con controles. Los resultados se analizaron mediante un modelo logístico ajustado por edad y sexo. Los datos se presentan como diagramas de caja * $P = 0,05$. ** $P = 0,01$. *** $P = 0,001$.

microARNs	NRQ Controles	NRQ IMIDs	p
miR-19a	1.536	1.195	0.325
miR-19b	0.571	0.212	< 0.001
miR-21	0.377	0.281	0.454
miR-26b	0.017	0.006	< 0.001
miR-27a	0.011	0.019	0.06
miR-29a	0.008	0.009	0.667
miR-93	0.003	0.001	0.086
miR-101	0.042	0.039	0.594
miR-125	0.007	0.007	0.307
miR-126	0.193	0.141	0.065
miR-142	0.077	0.102	0.495
miR-143	0.069	0.13	0.199
miR-146a	0.359	0.305	0.657
miR-150	0.035	0.029	0.613
miR-210	0.005	0.003	0.51
miR-191	0.318	0.275	0.37
miR-23a	32.12	20.12	0.996
miR-30c	0.141	0.151	0.293
miR-451	43.61	26.27	0.776

Tabla 14: Diferencias en niveles de microARNs en suero entre pacientes con IMIDs (enfermedades inflamatorias mediadas por la respuesta inmune) y controles sanos. Los niveles séricos de microARNs se expresan como la mediana de las NRQ (cantidades relativas normalizadas). Las diferencias se analizaron mediante la prueba T de

Student. Se aplicó una transformación de variable a los valores de expresión de microARNs para lograr una distribución normal para aplicar pruebas paramétricas.

Los análisis de la curva ROC para estos puntos de corte sugirieron que ambos microARNs eran discriminadores moderados entre pacientes con IMIDs y donantes sanos, siendo las áreas bajo la curva (AUC) 0,85 y 0,83 con alta sensibilidad 91,38% y 86,21%, pero baja especificidad 55,56% y 38,89, respectivamente (Figura 26). El análisis posterior de ambos microARNs mostró que la combinación de miR-19b y miR-26b en el modelo de regresión logró el mejor valor predictivo para la discriminación de enfermedades con un AUC de 0,89. Curiosamente, el aumento de los niveles de ambos biomarcadores tuvo un efecto protector sobre el desarrollo de IMIDs [Odds Ratio (OR) = 0,05 e intervalo de confianza del 95% (IC del 95%): 0,01-0,22 para miR-19b y OR = 0,07 (IC del 95%: 0,02-0,3) para miR-26b]. Los parámetros del modelo de regresión logística se resumen en la Figura 26.



Parameter	Pr	mir-19b	mir-26b	Combinated
AUC		0.85	0.83	0.89
95% CI (DeLong)		0.73-0.96	0.74-0.92	0.80-0.97
Sensitivity	Pr(+ D)	91.38%	86.21%	93.10%
Specificity	Pr(~D)	55.56%	38.89%	55.56%
Positive predictive value	Pr(D +)	86.89%	81.97%	87.10%
Negative predictive value	Pr(~D -)	66.67%	46.67%	71.43%
Correctly classified		82.89%	75.00%	84.21%

Model	crude OR(95%CI)	adj. OR(95%CI)	P(Wald's test)	P(LR-test)
miR-19b (high vs. low)	0.06 (0.02,0.25)	0.05 (0.01,0.22)	< 0.001	< 0.001
miR-26b (high vs. low)	0.08 (0.02,0.32)	0.07 (0.02,0.3)	< 0.001	< 0.001
Comb_mir-19b (high vs. low)	0.06 (0.02,0.25)	0.1 (0.02,0.5)	0.005	0.002
Comb_mir-26b (high vs. low)	0.08 (0.02,0.32)	0.16 (0.03,0.89)	0.036	0.028

Figura 26: MicroARNs séricos asociados con IMIDs (enfermedades inflamatorias mediadas por la respuesta inmune) [2]. Análisis de la curva de ROC (Receiver Operating Characteristic) realizados para

evaluar el valor diagnóstico de miR19b, miR26b circulante y la combinación de ambos para discriminar entre controles y pacientes con IMIDs. La tabla muestra áreas bajo la curva (AUC), porcentajes de casos correctamente predichos, intervalos de confianza del 95% (IC del 95%) y sensibilidades/especificidades de los análisis. Los resultados de ambos modelos se dan como razones de probabilidades (odds ratio) brutas (OR, IC del 95%) y ajustadas por sexo y edad (OR adj., IC del 95%).

Finalmente, analizamos la expresión de microARNs según la gravedad de la enfermedad (IMID leve o grave). El análisis de regresión logística multivariante reveló que la expresión tanto del miembro del subgrupo A1, miR-19a ($p < 0,05$), como del miembro del subgrupo A3, miR-143 ($p < 0,05$), aumentó significativamente en pacientes con enfermedad grave en comparación con pacientes con enfermedad leve (Figura 27 y Tabla 15). Las AUC para estos microARNs fueron 0,74 (IC del 95%: 0,6 a 0,87) y 0,75 (IC del 95%: 0,61 a 0,88), respectivamente (Figura 28).

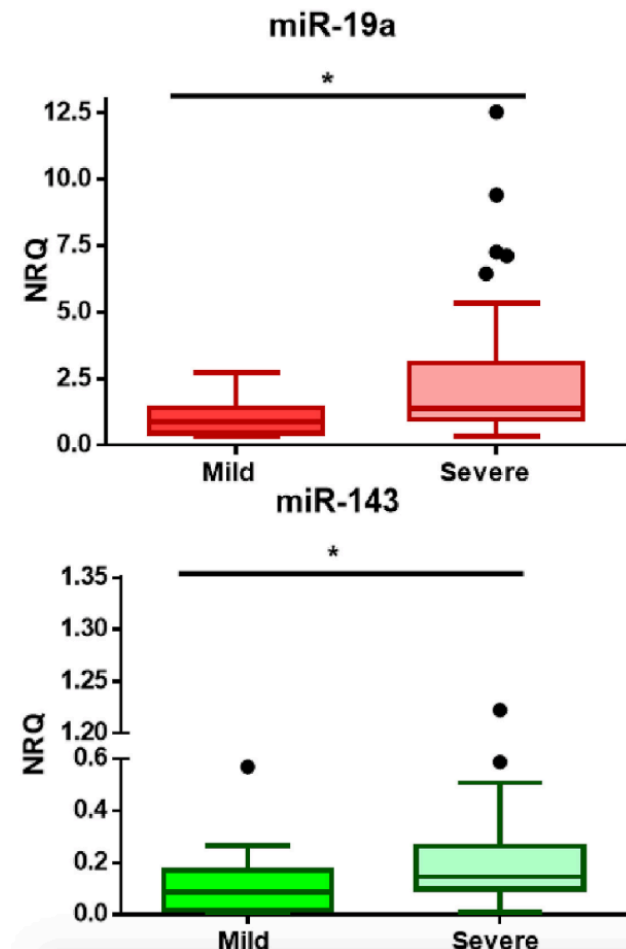
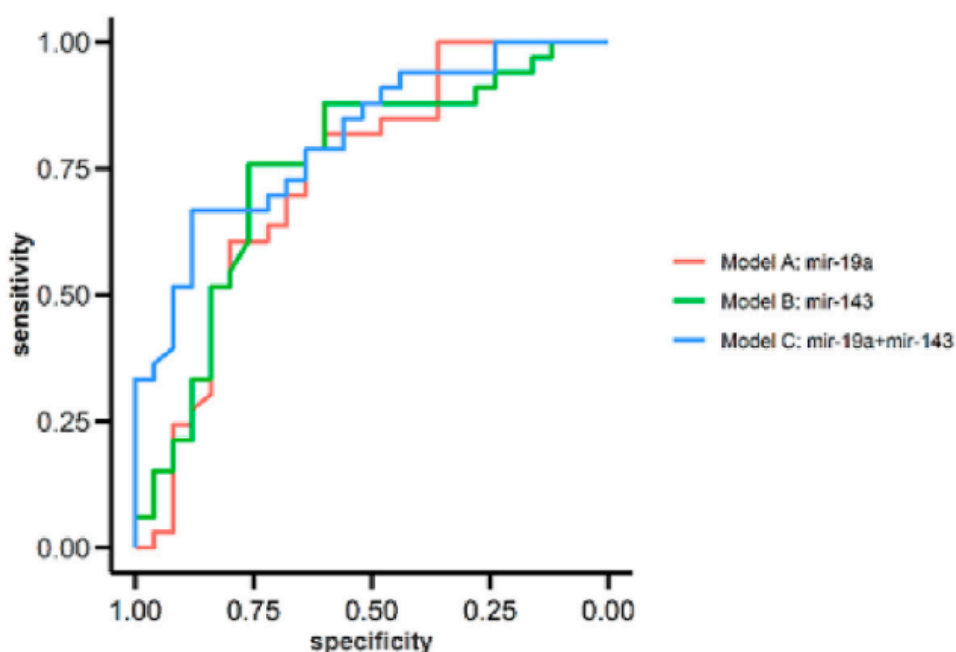


Figura 27: MicroARNs séricos asociados a gravedad de IMIDs (enfermedades inflamatorias mediadas por la respuesta inmune) [1]. NRQ (Cantidades relativas normalizadas) de microARNs estadísticamente significativas en muestras de suero de pacientes con IMID leve en comparación con pacientes con IMID grave. Los resultados se analizaron mediante un modelo de regresión logística ajustado por edad y sexo. Los datos se presentan como diagramas de caja * $P = 0,05$.

microARNs	NRQ leves	NRQ graves	p
miR-19a	0.911	1.4	0.014
miR-19b	0.22	0.212	0.312
miR-21	0.246	0.285	0.378
miR-26b	0.006	0.007	0.255
miR-27a	0.021	0.019	0.663
miR-29a	0.008	0.01	0.454
miR-93	0.001	0.002	0.091
miR-101	0.039	0.038	0.219
miR-125	0.008	0.006	0.151
miR-126	0.132	0.147	0.537
miR-142	0.099	0.108	0.932
miR-143	0.086	0.14	0.011
miR-146a	0.279	0.323	0.952
miR-150	0.029	0.028	0.888
miR-210	0.003	0.004	0.256
miR-191	0.23	0.319	0.029
miR-23a	16.9	23.8	0.633
miR-30c	0.124	0.156	0.12
miR-451	21.6	28.6	0.388

Tabla 15: Diferencias en niveles de microARNs en suero entre pacientes con IMIDs (enfermedades inflamatorias mediadas por la respuesta inmune) leves o graves. Los niveles séricos de microARN se expresan como la mediana de las NRQ (cantidades relativas normalizadas). Las diferencias se analizaron mediante la prueba T de Student. Se aplicó una transformación de variable a los valores de expresión de microARN para lograr una distribución normal y aplicar pruebas paramétricas.



Parameter	Pr	mir-19a	mir-143	Combined
AUC		0.74	0.75	0.81
95% CI (DeLong)		0.60-0.87	0.61-0.88	0.70-0.92
Sensitivity	Pr(+ D)	81.82%	78.79%	81.82%
Specificity	Pr(~D)	56.00%	64.00%	56.00%
Positive predictive value	Pr(D +)	71.05%	74.29%	71.05%
Negative predictive value	Pr(~D -)	70.00%	69.57%	70.00%
Correctly classified		70.69%	72.41%	70.69%

Model	crude OR(95%CI)	adj. OR(95%CI)	P(LR-test)
miR-19a (high vs. low)	5.73 (1.75,18.75)	7.6 (1.97,29.38)	0.001
miR-143 (high vs. low)	6.07 (1.77,20.82)	12.54 (2.77,56.83)	< 0.001
Comb_mir19a (high vs. low)	5.73 (1.75,18.75)	3.55 (0.77,16.31)	0.097
Comb_mir143 (high vs. Low)	6.07 (1.77,20.82)	6.99 (1.31,37.24)	0.018

Figura 28: MicroARNs séricos asociados a gravedad de IMiDs (enfermedades inflamatorias mediadas por la respuesta inmune) [2].
 Análisis de la curva ROC (Receiver Operating Characteristic) realizados para evaluar el valor diagnóstico de miR19a y miR-143 circulantes y la

combinación de los dos microARNs para discriminar entre enfermedad leve y grave. La tabla muestra áreas bajo la curva (AUC), porcentajes de casos correctamente predichos, intervalos de confianza del 95% (IC del 95%) y sensibilidades/especificidades de los análisis. Los resultados de ambos modelos se dan como razones de probabilidades (odds ratio) brutas (OR, IC del 95%) y ajustadas por sexo y edad (OR adj., IC del 95%).

Las mejores NRQ para la discriminación de la gravedad fueron 0,93 para miR-19a ($p = 0,05$) y 0,085 para miR-143 ($p = 0,04$). Las OR para estos microARNs fueron 7,6 y 12,54, respectivamente, lo que indica que su expresión aumentada representa un factor de riesgo para desarrollar una IMID grave. Curiosamente, la combinación de ambos parámetros tuvo un mejor valor predictivo con un AUC de 0,81 y un porcentaje de predicción del 70,69%. Los parámetros del modelo de regresión logística se resumen en la Figura 28. Resulta interesante observar que miR-19a y miR-143 se agrupan conjuntamente (convergen) en un grupo de microARNs estrechamente relacionados, como se muestra en el análisis global de microARNs (Figura 24). Estos datos sugieren que la alteración en la regulación de algunos microARNs podría ser un factor común para desarrollar una forma grave de IMID.

6.3.3. Expresión de microARNs en pacientes con psoriasis.

Tras el estudio conjunto respecto a expresión de microARNs en pacientes con IMIDs comparada con la de controles sanos, realizamos un subanálisis para determinar la expresión diferencial de microARNs entre pacientes con psoriasis y sujetos sanos. Nuestros datos mostraron que la expresión de los miembros del subgrupo B1: miR-19b ($p < 0,001$), miR-26b ($p < 0,001$) y miR-93 ($p < 0,01$) disminuyó significativamente en el grupo de psoriasis en comparación con el grupo control. En cambio, la expresión del miembro del subgrupo A3: miR-27a aumentó significativamente ($p < 0,01$) en los pacientes con psoriasis, respecto a los controles sanos (Figura 29). En este último caso, el análisis de la curva ROC respecto a la expresión de miR-27a mostró un alto valor predictivo, con un AUC de 0,82 (Figura 30).

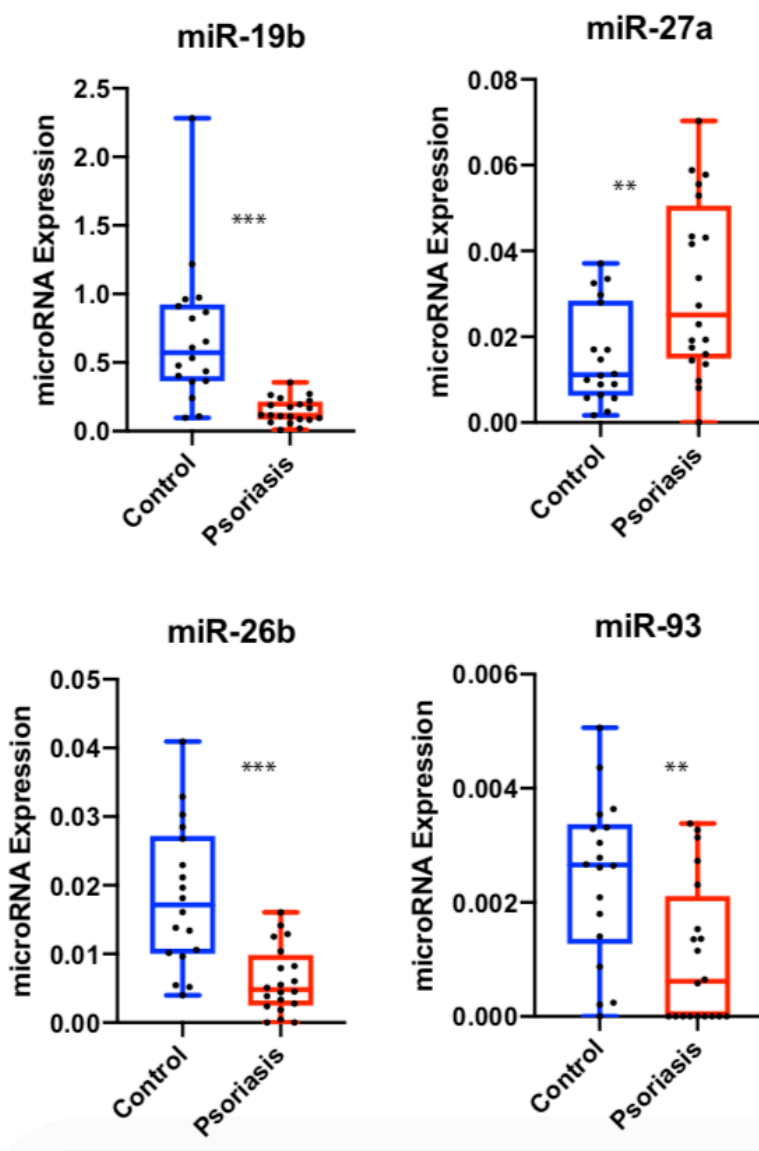


Figura 29: MicroARNs séricos asociados con psoriasis. Expresión de microARNs en NRQ (cantidad relativa normalizada) estadísticamente significativa en muestras de suero de pacientes con psoriasis en comparación con controles. Los resultados se analizaron mediante un

*modelo logístico ajustado por edad y sexo. Los datos se presentan como diagramas de caja * $P = 0,05$. ** $P = 0,01$. *** $P = 0,001$.*

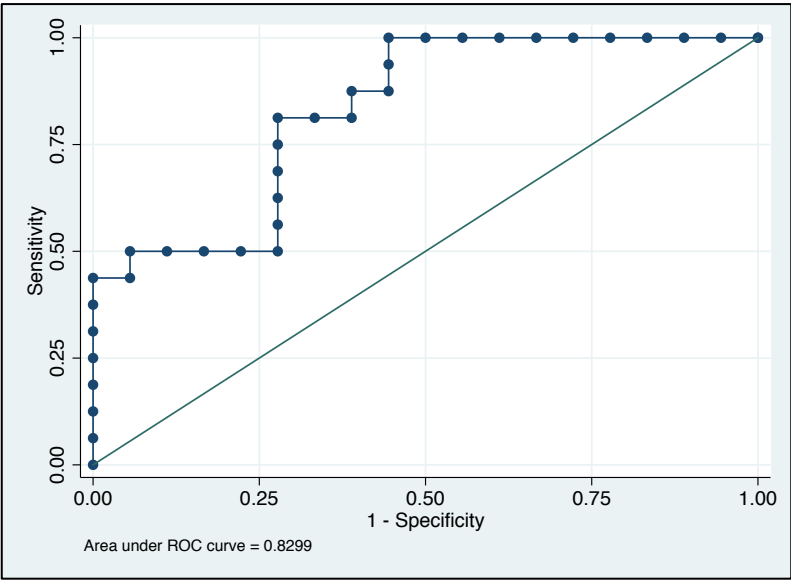


Figura 30: Expresión de miR-27a y psoriasis. *Análisis de la curva de ROC (Receiver Operating Characteristic) realizado para evaluar el valor diagnóstico de miR-27a circulante para discriminar entre controles y pacientes con psoriasis.*

Por último, se analizó la expresión de microARNs en pacientes con psoriasis y su relación con la gravedad de la enfermedad valorada mediante PASI. En este caso, la expresión de miR-19a y miR-191 se correlacionó de forma directamente proporcional con mayores cifras

de PASI y, por lo tanto, mayor gravedad de la psoriasis (miR-19a: Spearman $r = 0,58$, valor de $p = 0,02$; miR-191: Spearman $r = 0,67$, valor de $p = 0,1$) (Figura 31).

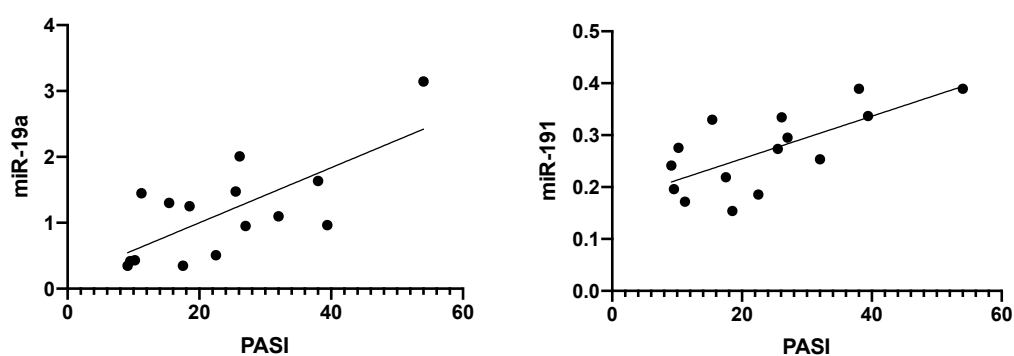


Figura 31: MicroARNs séricos y gravedad de psoriasis. Correlación entre los niveles séricos en NRQ (cantidad relativa normalizada) de miR-19a ($p = 0,02$) y miR-191 ($p = 0,1$) en pacientes con psoriasis y la gravedad de su enfermedad, valorada mediante PASI. Los datos se analizaron mediante la prueba de Spearman.

7. Discusión.

7.1. MicroARNs en piel psoriásica.

La expresión de perfiles concretos de microARNs en diferentes enfermedades autoinmunes ha originado distintas hipótesis sobre el potencial de “firmas” específicas de microARNs, principalmente circulantes, para predecir el pronóstico o la respuesta al tratamiento, destacando así el papel de estas moléculas como biomarcadores clínicos. En este sentido, se ha descrito recientemente una firma de microARNs, asociada con procesos de comunicación intercelular mediante vesículas extracelulares, que está aumentada en suero de pacientes con psoriasis, volviendo a niveles normales después de un tratamiento exitoso con anti-TNF- α [Torri et al., 2017]. El conocimiento sobre la expresión de microARNs en la piel de pacientes psoriásicos después del tratamiento es limitado. En este trabajo, identificamos la asociación de una regulación a la baja de miR-135b en la piel psoriásica con la mejora del PASI, mientras que la expresión de otros microARNs bien conocidos y regulados al alza en esta condición, no se modifica con el tratamiento a pesar de la mejoría de los pacientes.

El miR-31 de origen queratinocítico es uno de los microARNs más estudiados en psoriasis, con una expresión elevada de sus niveles en la piel lesional del paciente psoriásico [Landén et al., 2012]. En los

últimos años, se ha descrito que la activación de la señalización de NF- κ B en los queratinocitos induce la transcripción de miR-31, regulando el ciclo celular de los queratinocitos [Yan et al., 2015]. De esta forma, podríamos esperar que sus niveles se redujeran después de tres meses de tratamiento con agentes biológicos y con una respuesta clínica paralela. Sin embargo, no detectamos diferencias significativas en los niveles de miR-31 entre la piel lesional y la piel con lesiones residuales. La expresión de miR-142-3p y miR-146a tampoco disminuyó después del tratamiento, aunque se ha descrito que los niveles circulantes de estos microARNs están regulados a la baja en pacientes que responden a etanercept y adalimumab, respectivamente [Pivarcsi et al., 2013; Mensà., 2018], así como se ha descrito la persistencia de niveles séricos de miR-146a en pacientes con psoriasis después de un tratamiento biológico [Torri et al., 2017]. El hecho de que los niveles de miR-31, miR-142 y miR-146a en la piel psoriásica no cambien después del tratamiento con biológicos sugiere su asociación con procesos que prevalecen sobre los efectos de éste, como podría ser el caso de miR-146a-5p, altamente expresado por las células T reguladoras y fundamental para su función [Lu et al., 2010]. No obstante, no se puede descartar que los niveles de estos microARNs disminuyan después de un período de tratamiento más largo.

Aunque el estudio de microARNs individuales es muy útil, la función biológica de estas moléculas no puede entenderse como la represión de una o algunas dianas por un único microARN. El análisis de

enriquecimiento mediante el sistema PANTHER identificó varias dianas de los microARNs, cuya regulación estaba alterada, que se asociaron significativamente con la respuesta inmune y los procesos de angiogénesis. Varios de estos genes eran dianas de miR-9-5p, miR-133a y miR-375, lo que respalda la noción de su participación en la psoriasis y la importancia de trazar una imagen completa de la expresión de microARNs en esta enfermedad. Se ha descrito muy recientemente que miR-9-5p protege contra la inflamación mediante la inhibición de NF- κ B [Ou et al., 2019; Yue et al., 2019]. MiR-9-5p también regula la expresión de ATG5 (relacionado con la autofagia 5) [Gundara et al., 2014] y, recientemente, se ha informado de su sobreexpresión en la piel psoriásica [Wang et al., 2020]. Además, la ablación queratinocito-específica de ATG5 mejoró las lesiones cutáneas inducidas por imiquimod en ratones, acompañado de una reducción en el número de células productoras de IL-17A [Wang et al., 2020], destacando el papel de esta diana en la psoriasis. Por otro lado, se ha detectado una regulación a la baja de miR-133a en el asma y su regulación al alza es capaz de mejorar la remodelación de las vías respiratorias a través de las vías de señalización PI3K/AKT/mTOR, actuando sobre el IGFR1 (receptor del factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1) [Shao et al., 2018]. El IGFR1 juega un papel importante en la diferenciación y la apoptosis de muchos tipos de células, incluidos los queratinocitos, y se sobreexpresa en lesiones psoriásicas [Krane et al., 1992]. La administración de oligonucleótidos anti-sentido IGFR1 en lesiones psoriásicas humanas injertadas en

ratones provocó una mejora significativa de la epidermis hiperplásica [Wraight et al., 2000]. IGFR1 es también una diana validada para miR-375 [Ye et al., 2014], lo que aumenta las posibilidades de que su sobreexpresión en la piel psoriásica pueda estar asociada con los niveles más bajos de estos microARNs. La vía de señalización JAK2/STAT3 está involucrada tanto en procesos inflamatorios como antiinflamatorios [Rawlings et al., 2004] y existen pruebas sólidas con respecto a la regulación funcional de esta vía por el miR-375 [Ding et al., 2010]. En pacientes con cardiomiopatía inflamatoria, los niveles de miR133a se correlacionan con una mejor función cardíaca y un mejor pronóstico clínico [Besler et al., 2016], y la inhibición de miR-375 atenúa la respuesta inflamatoria después de un infarto de miocardio, lo que respalda la idea de un papel protector de estos microARNs en los procesos inflamatorios.

Al identificar los microARNs expresados diferencialmente no validados previamente en psoriasis, realizamos ensayos de NGS en cinco muestras de piel de pacientes con psoriasis (lesional y no lesional) y cinco muestras de piel de controles sanos. Aunque con este número limitado de muestras pudimos detectar la expresión diferencial de microARNs no descritos en psoriasis, una “n” mayor habría generado probablemente diferencias en un número mayor de microARNs entre grupos, siendo posiblemente la razón por la que no se detectan diferencias en miR-146a como se ha descrito en otros estudios [Zhang et al., 2014].

El único microARN que identificamos, cuya modulación después del tratamiento se asoció con la mejora del PASI fue el miR-135b. Aunque hace varios años se describió la regulación al alza de este microARN en la piel psoriásica [Joyce et al., 2011], su asociación con la respuesta al tratamiento no se ha descrito previamente. Aunque el estudio del papel funcional de este microARN en la psoriasis está fuera del alcance del presente trabajo, nuestros resultados y el conocimiento que hemos adquirido sobre la función del miR-135b indican que este microARN podría estar implicado en el proceso inflamatorio asociado a esta patología. Este microARN se ha relacionado principalmente con procesos tumorales y se ha asociado con múltiples funciones que probablemente justifiquen su importancia en la psoriasis. Por ejemplo, miR-135b promueve la angiogénesis mediante la regulación de dos objetivos, FOXO1 y HIF1a [Bai et al., 2019; Umezu et al., 2014]. FOXO1 es un factor de transcripción que regula la homeostasis metabólica en respuesta al estrés oxidativo y tiene un papel clave en la función y el desarrollo de las células T reguladoras [Hedrick et al., 2012; Ouyang et al., 2012]. Curiosamente, las células T reguladoras de la psoriasis tienen alteraciones en la regulación de la vía de señalización Akt-FOXO1 [Li et al., 2019] y, de hecho, se han descrito células T reguladoras disfuncionales o reducidas en sangre periférica y en piel con lesiones en pacientes con psoriasis [Sugiyama et al., 2005; Keijsers et al., 2013; Kotb et al., 2018]. Recientemente se ha destacado la relevancia de las células T reguladoras locales en la inflamación cutánea, donde el uso del modelo murino de psoriasis inducida por

imiquimod demostró que las células T reguladoras limitan la exacerbación de la inflamación cutánea local e inician también la remisión de la enfermedad [Hartwig et al., 2018]. Se sabe que la presencia de las células T reguladoras aumenta en la piel de los pacientes con psoriasis después del tratamiento tópico con esteroides [Chen et al., 2008] y que los fármacos anti-TNF- α inducen la regulación positiva de las T reguladoras circulantes que a su vez se correlaciona con reducciones en las escalas de gravedad de la enfermedad [Richetta et al., 2011]. Se ha descrito un hallazgo similar en un modelo murino de psoriasis en el que la administración de anti-IL-17A o IL-23p19 indujo un aumento significativo en el número de células T reguladoras FOXP3⁺ IL-10⁺ [Shimizu et al., 2019]. Además, se sabe que el bloqueo de miR-135b atenúa la producción de IL-17 en el linfoma de células anaplásicas [Matsuyama et al., 2011]. Serían necesarios estudios adicionales para dilucidar el papel de miR-135b en estos procesos durante el desarrollo de la psoriasis. Nuestros resultados destacan el potencial de este microARN como biomarcador y revelan que los niveles basales de miR-135b en la piel lesionada podrían ayudar a identificar aquellos pacientes con mayores expectativas de mejora ante el tratamiento con biológicos, independientemente de la diana terapéutica utilizada.

7.2. MicroARNs en suero de pacientes con psoriasis u otras IMIDs.

La evidencia acumulada hasta ahora apoya el uso de los microARNs como biomarcadores de pronóstico de enfermedad y como una valiosa estrategia de diagnóstico [Wang et al., 2016]. Los microARNs son específicos, estables y están presentes en el suero, por lo que podrían ser útiles como herramientas de diagnóstico mínimamente invasivas para diversas enfermedades, así como para la investigación de nuevos objetivos terapéuticos [Heegaard et al., 2015]. Dado que los microARNs podrían desempeñar un papel en el mantenimiento de la tolerancia inmunológica y la prevención de la autoinmunidad, en este estudio queríamos analizar microARNs inmunológicamente relevantes en diferentes IMIDs, incluidos la psoriasis, la EG y la AR. Un punto a destacar importante en esta investigación reside en el hecho de que hemos buscado marcadores que no sólo fueran específicos de cada enfermedad, sino que también afecten a eventos comunes presentes en varias IMIDs, revelando así vínculos potentes, aunque no obvios, entre los diferentes tipos de IMID. Este es un enfoque innovador para el diagnóstico, ya que los estudios anteriores generalmente se han centrado en una IMID específica. En este sentido, nuestros resultados pueden tener implicaciones importantes en el manejo de forma conjunta de todos estos trastornos vinculados, ya que permitirían

evaluar la posibilidad de desarrollo de diferentes IMIDs en un paciente concreto.

En este estudio hemos encontrado un perfil de microARNs distintivo, caracterizado por una regulación negativa significativa de miR-19b y miR-26b, como posible regulador del desarrollo de IMIDs. MiR-19b es parte del grupo miR-17-92, que regula las respuestas de las células T CD4 + frente a antígeno y promueve las respuestas Th17 [Jiang et al., 2011; Liu et al., 2014; Kuo et al., 2019]. Además, miR-19b está regulado a la baja en los monocitos de pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES) y síndrome antifosfolípido (SAF), en los que es fundamental para la modulación de la expresión del factor tisular [Teruel et al., 2011]. También se ha demostrado que miR-26b juega un papel en la inflamación y la secreción de citoquinas inflamatorias en la AR y como modulador de la respuesta inmune en la artrosis [Sun et al., 2015; Yin et al., 2017]. De igual forma, miR-26b se dirige contra el factor inflamatorio prostaglandina-endoperoxido sintasa 2 (PTGS2) que desempeña un papel importante en las enfermedades inflamatorias que inducen la producción de prostaglandina E2 (PGE2) [Ji et al., 2010; Liu et al., 2015]. Resulta interesante que estos dos microARNs compartan el mismo subgrupo (B1) con miR-21 y miR-126, lo que sugiere que sus funciones puedan estar estrechamente relacionadas entre sí. De hecho, miR-21 se ha asociado en gran medida con el desarrollo de enfermedades autoinmunes, desempeñando un papel importante en el sistema inmunológico [Wang et al., 2016]. Sin

embargo, no hemos observado diferencias significativas en la expresión relativa de miR-21 y miR-126 en los pacientes con IMIDs estudiados. Esto podría deberse a la combinación en nuestro análisis de varios IMIDs como grupo completo o a la comparación de todos ellos con controles. En este sentido, estudios previos han presentado resultados discordantes respecto a estos dos microARNs en IMIDs, con hallazgos de expresión disminuida o aumentada dependiendo de la enfermedad específica o el tipo de muestra analizada (Tabla Suplementaria 5).

Aunque hay diversas publicaciones que describen perfiles comparativos de los niveles de microARNs circulantes entre pacientes con enfermedades autoinmunes y controles sanos, es limitada la información sobre perfiles de microARNs asociados con fenotipos específicos en pacientes con IMIDs, especialmente con respecto a la gravedad de la enfermedad. En este sentido, hemos descrito que dos microARNs (miR-19a y miR-143) pertenecientes al grupo A muestran niveles aumentados en pacientes con enfermedad grave en comparación con aquellos con enfermedad leve. Resulta llamativo que los microARNs que diferencian a los pacientes de los controles sanos (miR-19b y miR26b) estén ubicados en un grupo diferente de los que diferencian la enfermedad grave de la leve. Esto sugiere que las vías involucradas en el desarrollo de las IMIDs pueden ser diferentes de las que regulan su gravedad.

En relación con la gravedad de la enfermedad, nuestros resultados mostraron una asociación entre niveles elevados de miR-19a y miR-143 circulantes y pacientes con mayor estado inflamatorio. Algunos objetivos de estos microARNs son moléculas pro-inflamatorias, como TNF- α [Liu et al., 2011; Kopp et al., 2013], TLR2 [Philippe et al., 2012] y moléculas implicadas en la vía de señalización de las MAPK [Akao et al., 2009], lo que sugiere que miR-19a y miR-143 podrían estar implicados en bucles de retroalimentación negativa. Esto podría explicar por qué miR-19a también se ha asociado con brotes en la actividad psoriásica y con otras IMIDs no evaluadas en este estudio, como la esclerosis múltiple (EM) y la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) [Ghadiri et al., 2018; Oyama et al., 2011; Schaefer et al., 2015].

Con respecto a miR-19a y los otros miembros del grupo A1 (miR-101, miR-23a y miR-451), algunos de sus objetivos también desempeñan funciones antiinflamatorias o reguladoras. Estos objetivos incluyen los inhibidores de la vía JAK/STAT: SOCS1 y SOCS3 [Pichiorri et al., 2008; Chen et al., 2019], los inhibidores de la vía NF κ B: IKK α (también conocido como CHUK) e IKBKB [56,57], fosfatasas como PTEN, que regula negativamente la activación de linfocitos [Shrestha et al., 2015; Buckler et al., 2008] y DUSP1 [Lewis et al., 2003; Zhu et al., 2010] y el factor de transcripción relacionado con TGF- β : SMAD4 [Tsai et al., 2010]. Por lo tanto, en algunas IMIDs en las que se altera la regulación de la producción o señalización del TNF o el TLR, la regulación al alza

de miR-19a y algunos otros miembros de su grupo puede dar lugar a la cronificación de la enfermedad en formas más graves debido a la regulación a la baja de vías antiinflamatorias.

8. Conclusiones:

1. MiR-9-5p, miR-133a-3p y miR-375 se regulan a la baja en piel lesional de los pacientes con psoriasis.
2. Después del tratamiento, la expresión de miR-133a-3p, miR-375, miR-378a y miR-135b en las lesiones residuales se iguala con los niveles observados en la piel no lesional.
3. La disminución de los niveles de expresión de miR-135b después del tratamiento con terapias biológicas se asocia con la mejoría de los pacientes evaluada mediante PASI.
4. La disminución de los niveles de expresión de miR-135b después del tratamiento con terapias biológicas se asocia con la disminución de la respuesta inflamatoria local (S100A9).
5. La mayor expresión basal de miR-135b junto con la edad se asocian con una mayor mejoría del PASI tras el tratamiento con terapias biológicas.
6. Los niveles circulantes de miR-19b y miR-26b disminuyen significativamente en pacientes con psoriasis u otras IMIDs en comparación con controles sanos. Los niveles circulantes de miR-93 también disminuyen de forma significativa sólo en los pacientes con psoriasis respecto al grupo control.

7. Los niveles séricos de miR-27a aumentan de forma significativa en los pacientes con psoriasis, comparados con controles sanos.
8. Los niveles circulantes de miR-19b y miR-26b son discriminadores capaces de identificar la presencia de psoriasis u otra IMID.
9. MiR-19a y miR-143 aumentan significativamente en pacientes con psoriasis u otra IMID con afectación grave.
10. Los niveles séricos de miR-19a y miR-191 se correlacionan de forma directamente proporcional con mayor gravedad en la expresión de la psoriasis valorada mediante PASI.

9. Bibliografía:

1. Abdallah MA, Abdel-Hamid MF, Kotb AM, et al. Serum interferon-gamma is a psoriasis severity and prognostic marker. *Cutis*. 2009;84:163-168.
2. Abdel-Hamid MF, Aly DG, Saad NE, et al. Serum levels of interleukin-8, tumor necrosis factor- α and γ -interferon in Egyptian psoriatic patients and correlation with disease severity. *J Dermatol*. 2011;38:442-446.
3. Akao Y, Nakagawa Y, Iio A, et al. Role of microARN-143 in Fas-mediated apoptosis in human T-cell leukemia Jurkat cells. *Leuk Res*. 2009;33:1530-1538.
4. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, et al. Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League against Rheumatism collaborative initiative. *Ann Rheum Dis*. 2010;69:1580-1588.
5. Ambrosi A, Espinosa A, Wahren-Herlenius M. IL-17: a new actor in IFN-driven systemic autoimmune diseases. *Eur J Immunol*. 2012;42:2274-2284.
6. Ameling S, Kacprowski T, Chilukoti RK, et al. Associations of circulating plasma microARNs with age, body mass index and sex in a population-based study. *BMC Med Genom*. 2015;8:61.
7. Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based

variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer datasets. *Canc Res*. 2004;64:5245-5250.

8. Annunziato F, Cosmi L, Santarlaschi V, et al. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med*. 2007;204:1849-61.
9. Ariza ME, Williams MV, Wong HK. Targeting IL-17 in psoriasis: from cutaneous immunobiology to clinical application. *Clin Immunol*. 2013;146:131-139.
10. Armstrong AW, Guerin A, Sundaram M, et al. Psoriasis and risk of diabetes-associated microvascular and macrovascular complications. *J Am Acad Dermatol*. 2015;72:968-977.
11. Armstrong AW, Harskamp CT, Armstrong EJ. Psoriasis and metabolic syndrome: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *J Am Acad Dermatol*. 2013;68:654-662.
12. Armstrong AW, Harskamp CT, Armstrong EJ. Psoriasis and the risk of diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. *JAMA Dermatol*. 2013;149:84-91.
13. Armstrong AW, Harskamp CT, Ledo L, et al. Coronary artery disease in patients with psoriasis referred for coronary angiography. *Am J Cardiol*. 2012;109:976-980.
14. Armstrong AW, Read C. Pathophysiology, Clinical Presentation, and Treatment of Psoriasis: A Review. *JAMA*. 2020;323:1945-1960.

15. Armstrong AW, Voyles SV, Armstrong EJ, et al. A tale of two plaques: convergent mechanisms of T-cell-mediated inflammation in psoriasis and atherosclerosis. *Exp Dermatol*. 2011;20:544-549.
16. Asarch A, Barak O, Loo DS, et al. Th17 cells: A new therapeutic target in inflammatory dermatoses. *J Dermatolog Treat*. 2008; 19:318-326.
17. Aujla SJ, Dubin PJ, Kolls JK. Th17 cells and mucosal host defense. *Semin Immunol*. 2007;19:377-382.
18. Aujla SJ, Kolls JK. IL-22: A critical mediator in mucosal host defense. *J Mol Med*. 2009; 87:451-454.
19. Austin LM, Ozawa M, Kikuchi T, et al. The majority of epidermal T cells in Psoriasis vulgaris lesions can produce type 1 cytokines, interferon-gamma, interleukin-2, and tumor necrosis factor-alpha, defining TC1 (cytotoxic T lymphocyte) and Th1 effector populations: a type 1 differentiation bias is also measured in circulating blood T cells in psoriatic patients. *J Invest Dermatol*. 1999;113:752-759.
20. Bahn JH, Zhang Q, Li F, et al. The landscape of microRNA, Piwi-interacting RNA, and circular RNA in human saliva. *Clin Chem*. 2015;61:221-30.
21. Bai M, Li J, Yang H, et al. miR-135b Delivered by Gastric Tumor Exosomes Inhibits FOXO1 Expression in Endothelial Cells and Promotes Angiogenesis *Mol Ther*. 2019;27:1772-1783.
22. Baker BS, Ovigne JM, Powles AV, et al. Normal keratinocytes express Toll-like receptors (TLRs) 1, 2 and 5: modulation of TLR

- expression in chronic plaque psoriasis. *Br J Dermatol*. 2003;148:670-679.
23. Baltimore D, Boldin MP, O'Connell RM, et al. MicroARNs: new regulators of immune cell development and function. *Nat Immunol*. 2008;9:839-845.
24. Barna M, Snijderwint FGM, Van der Heijden FL, et al. Characterization of lesional psoriatic skin T lymphocyte clones. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)*. 1994;186:9-11.
25. Bartalena L, Baldeschi L, Boboridis K, et al. On behalf of the European group on Graves' orbitopathy (EUGOGO), the 2016 European thyroid association/European group on Graves' orbitopathy guidelines for the management of Graves' orbitopathy. *EurThyroid J*. 2016;5:9-26.
26. Bartel DP. MicroARNs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004;116:281-297.
27. Barter RL, Yu B. Superheat: an R package for creating beautiful and extendable heatmaps for visualizing complex data. *J Comput Graph Stat*. 2018;27:910-922.
28. Begon E, Michel L, Flageul B, et al. Expression, sub-cellular localization and cytokine modulation of Toll-like receptors (TLRs) in normal human keratinocytes: TLR2 up-regulation in psoriatic skin. *Eur J Dermatol*. 2007;17:497-506.
29. Benes V, Collier P, Kordes C, et al. Identification of cytokine-induced modulation of microARN expression and secretion as

measured by a novel microARN specific PCRassay. *Sci Rep*. 2015;5:11590.

30. Benhadou F, Mintoff D, Del Marmol V. Psoriasis: keratinocytes or immune cells - which is the trigger? *Dermatology*. 2019;235:91-100.
31. Beringer A, Noack M, Miossec P. Il-17 in chronic inflammation: from discovery to targeting. *Trends Mol Med*. 2016;22:230-241.
32. Besler C, Urban D, Watzka S, et al. Endomyocardial miR-133a levels correlate with myocardial inflammation, improved left ventricular function, and clinical outcome in patients with inflammatory cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail*. 2016;18:1442-1451.
33. Black AP, Ardern-Jones MR, Kasprovicz V, et al. Human keratinocyte induction of rapid effector function in antigen-specific memory CD4+ and CD8+ T cells. *Eur J Immunol*. 2007;37:1485–1493.
34. Boehncke WH, Schön MP. Psoriasis. *Lancet*. 2015;386:983-94.
35. Bos JD, Hulsebosch HJ, Krieg SR, et al. Immunocompetent cells in psoriasis: in situ immuno- phenotyping by monoclonal antibodies. *Arch Dermatol Res*. 1983;275:181-9.
36. Boyman O, Conrad C, Tonel G, et al. The pathogenic role of tissue-resident immune cells in psoriasis. *Trends Immunol*. 2007;28:51-57.
37. Boyman O, Hefti HP, Conrad C, et al. Spontaneous development of psoriasis in a new animal model shows an essential role for resident

- T cells and tumor necrosis factor- α . *J Exp Med*. 2004;199:731-736.
38. Büchau AS, Gallo RL. Innate immunity and antimicrobial defense systems in psoriasis. *Clin Dermatol*. 2007;25:616-24.
 39. Buckler JL, Liu X, Turka LA. Regulation of T-cell responses by PTEN. *Immunol Rev*. 2008;224:239-248.
 40. Cao W, Rosen DB, Ito T, et al. Plasmacytoid dendritic cell- specific receptor ILT7-Fc epsilonRI gamma inhibits Toll-like receptor-induced interferon production. *J Exp Med*. 2006;203:1399-1405.
 41. Carmona L, Cross M, Williams B, et al. Rheumatoid arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2010;24:733-45.
 42. Carmona L, Villaverde V, Hernández-García C, et al. EPISER Study Group, the prevalence of rheumatoid arthritis in the general population of Spain. *Rheumatology*. 2002;41:88-95.
 43. Carrascosa JM, Pujol R, Daudén E, et al. A prospective evaluation of the cost of psoriasis in Spain (EPIDERMA project: phase II). *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2006;20:840-845.
 44. Casciano F, Pigatto PD, Secchiero P, et al. T cell hierarchy in the pathogenesis of psoriasis and associated cardiovascular comorbidities. *Front Immunol*. 2018;9:1390.
 45. Cella M, Fuchs A, Vermi W, et al. A human natural killer cell subset provides an innate source of IL-22 for mucosal immunity. *Nature*. 2009;457:722–725.
 46. Cella X. A human natural killer cell subset provides an innate source of IL-22 for mucosal immunity. *Nature*. 2009; 457:722-725.

47. Chalmers RJ. Assessing psoriasis severity and outcomes for clinical trials and routine clinical practice. *Dermatol Clin.* 2015;33:57-71.
48. Chen L, Shen Z, Wang G, et al. Dynamic frequency of CD4+CD25+Foxp3+ Treg cells in Psoriasis vulgaris. *J Dermatol Sci.* 2008;51:200-203.
49. Chen Y, Wang W, Chen Y, et al. MicroARN-19a-3p promotes rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes via targeting SOCS3. *J Cell Biochem.* 2019; doi: 10.1002/jcb.28442. Epub ahead of print.
50. Chicharro P, García-Río I, Rodríguez-Jiménez P, et al. Prevalence of amyloid deposits determined by fine-needle aspiration of abdominal fat in patients with psoriasis. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2017;31:e280-e281.
- 51.** Chicharro P, Rodríguez-Jiménez P, De la Fuente H, et al. Mixed profile of cytokines in paradoxical eczematous eruptions associated with anti-IL-17 therapy. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2020;18:E30708.
52. Chicharro P, Rodríguez-Jiménez P, Llamas-Velasco M, et al. Expression of miR-135b in psoriatic skin and its association with disease improvement. *Cells.* 2020;9:E1603.
53. Chicharro P, Sánchez-Moya A, Rodríguez-Jiménez P, et al. Tuberculosis re-screening in psoriatic patients under continuous biological therapy. Does the treatment modify the tuberculin skin test response? *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2019;33:e295-e296.

54. Chodorowska G. Plasma concentrations of IFN- γ and TNF- α in psoriatic patients before and after local treatment with dithranol ointment. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 1998;10:147-151.
55. Chowdhari S, Saini N. Hsa-miR-4516 mediated downregulation of STAT3 / CDK6 / UBE2N plays a role in PUVA induced apoptosis in keratinocytes. *J Cell Physiol*. 2014;229:1630-1638.
56. Cobb BS, Nesterova TB, Thompson E, et al. T cell lineage choice and differentiation in the absence of the RNase III enzyme Dicer. *J Exp Med*. 2005;201:1367-1373.
57. Conrad C, Boyman O, Tonel G, et al. Alpha1beta1 integrin is crucial for accumulation of epidermal T cells and the development of psoriasis. *Nat Med*. 2007;13:836-842.
58. Cosnes J, Gower-Rousseau C, Seksik P, et al. A. Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*. 2011;140:1785-1794.
59. Cua DJ, Tato CM. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2010;10:479-489.
60. Cui C, Yang W, Shi J, et al. Identification and Analysis of Human Sex-biased MicroARNs. *Genom Proteom Bioinform*. 2018;16:200-211.
61. Cuperus JT, Fahlgren N, Carrington JC. Evolution and functional diversification of MIRNA genes. *Plant Cell*. 2011;23:431-42.
62. Daudén E, Castañeda S, Suárez C, et al. Clinical practice guideline for an integrated approach to comorbidity in patients with psoriasis: approach to comorbidity in psoriasis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2013;27:1387-1404.

63. Deng X, Su Y, Wu H, Wu R, et al. The role of microRNAs in autoimmune diseases with skin involvement. *Scand J Immunol*. 2015;81:153-165.
64. Dey AK, Joshi AA, Chaturvedi A, et al. Association between skin and aortic vascular inflammation in patients with psoriasis: a case-cohort study using positron emission tomography/computed tomography. *JAMA Cardiol*. 2017;2:1013-1018.
65. Di Meglio P, Nestle FO. The role of IL-23 in the immunopathogenesis of psoriasis. *F1000 Biol Rep*. 2010;2:40.
66. Ding L, Xu Y, Zhang W, et al. MiR-375 frequently downregulated in gastric cancer inhibits cell proliferation by targeting JAK2. *Cell Res*. 2010;20:784-793.
67. Duhon T, Geiger R, Jarrossay D et al. Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nat Immunol*. 2009;10:857-863.
68. Duvallet E, Semerano L, Assier E et al. Interleukin-23: A key cytokine in inflammatory diseases. *Ann Med*. 2011;43:503-511
69. Dzionek A, Sohma Y, Nagafune J, et al. BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type II C-type lectin, mediates antigen capture and is a potent inhibitor of interferon alpha/beta induction. *J Exp Med*. 2001;194:1823-1834.
70. Eedy DJ, Burrows D, Bridges JM, et al. Clearance of severe psoriasis after allogeneic bone marrow transplantation. *BMJ*. 1990;300:908.

71. Esteller M. Non-coding RNAs in human disease. *Nat Rev Genet.* 2011;12:861-874.
72. Esteve-Vives J, Batlle-Gualda E, Reig A. Spanish version of the Health Assessment Questionnaire: reliability, validity and transcultural equivalency. Grupo para la Adaptación del HAQ a la Población Española. *J Rheumatol.* 1992;20:2116-2122.
73. Farahnik B, Beroukhim K, Zhu TH, et al. Ixekizumab for the treatment of psoriasis: A review of phase III trials. *Dermatol Ther (Heidelb).* 2016;6:25-37.
74. Feldmeyer L, Keller M, Niklaus G, et al. The inflammasome mediates UVB-induced activation and secretion of interleukin-1beta by keratinocytes. *Curr Biol.* 2007;17:1140-1145.
75. Feng C, Bai M, Yu NZ, et al. MicroRNA-181b negatively regulates the proliferation of human epidermal keratinocytes in psoriasis through targeting TLR4. *J Cell Mol Med.* 2017;21:278–285.
76. Ferrandiz C, Bordas X, García-Patos V, et al. Prevalence of psoriasis in Spain (epiderma project: phase I). *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2001;15:20-23.
77. Fredriksson T, Pettersson U. Severe psoriasis-oral therapy with a new retinoid. *Dermatologica.* 1978;157:238-244.
78. Friedman R, Farh KK, Burge CB, et al. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microARNs. *Genome Res.* 2008;19:92-105.
79. Funk J, Langeland T, Schrumpf E, et al. Psoriasis induced by interferon-alpha. *Br J Dermatol.* 1991;125:463-5.

80. Gaffen SL, Jain R, Garg AV, et al. The IL-23-IL-17 immune axis: from mechanisms to therapeutic testing. *Nat Rev Immunol.* 2014;14:585-600.
81. Gallais S  r  zal I, Classon C, Cheuk S, et al. Resident T cells in resolved psoriasis steer tissue responses that stratify clinical outcome. *J Invest Dermatol.* 2018;138:1754-1763.
82. Gardembas-Pain M, Ifrah N, Foussard C, et al. Psoriasis after allogeneic bone marrow transplantation. *Arch Dermatol* 1990;126: 1523.
83. Garo LP, Murugaiyan G. Contribution of MicroARNs to autoimmune diseases. *Cell Mol Life Sci.* 2016;73:2041-2051.
84. Ghadiri N, Emamnia N, Ganjalikhani-Hakemi M, et al. Analysis of the expression of mir-34a, mir-199a, mir-30c and mir-19a in peripheral blood CD4+T lymphocytes of relapsing-remitting multiple sclerosis patients. *Gene.* 2018;659:109-117.
85. Ghafouri-Fard S, Eghtedarian R, Taheri M, et al. The eminent roles of ncRNAs in the pathogenesis of psoriasis. *Noncoding RNA Res.* 2020;5:99-108.
86. Girolomoni G, Strohal R, Puig L, et al. The role of IL-23 and the IL-23/Th 17 immune axis in the pathogenesis and treatment of psoriasis. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2017;31:1616-1626.
87. Gong HB, Zhang SL, Wu XJ, et al. Association of rs2910164 polymorphism in MiR-146a gene with psoriasis susceptibility. *Medicine* 2019;98:e14401.

88. Gooderham M, Posso-De Los Rios CJ, Rubio-Gomez GA, et al. Interleukin-17 (IL-17) inhibitors in the treatment of plaque psoriasis: a review. *Skin Therapy Lett.* 2015;20:1-5.
89. Gottlieb AB, Chamian F, Masud S, et al. TNF inhibition rapidly down-regulates multiple proinflammatory pathways in psoriasis plaques. *J Immunol.* 2005;175:2721-2729.
90. Griffiths CE, Powles AV, Leonard JN, et al. Clearance of psoriasis with low dose cyclosporin. *Br Med J (Clin Res Ed).* 1986;293:731-732.
91. Grousson J, Concha M, Schmitt D, et al. Effects of CD40 ligation on human keratinocyte accessory function. *Arch Dermatol Res.* 1998;290:325-330.
92. Gu X, Nylander E, Coates PJ, et al. Effect of narrow-band ultraviolet B phototherapy on p63 and microRNA (miR-21 and miR-125b) expression in psoriatic epidermis. *Acta Derm Venereol.* 2011;91:392-397.
93. Gundara JS, Zhao J, Gill AJ, et al. Noncoding RNA blockade of autophagy is therapeutic in medullary thyroid cancer. *Cancer Med.* 2014;4:174-182.
94. Gutowska-Owsiak D, Schaupp AL, Salimi M, et al. Interleukin- 22 downregulates filaggrin expression and affects expression of profilaggrin processing enzymes. *Br J Dermatol.* 2011;165:492-498.
95. Hadjicharalambous MR, Lindsay MA, Long non-coding RNAs and the innate immune response. *Noncoding RNA.* 2019;5:34.

96. Harper EG, Guo CH, Rizzo H, et al. Th17 Cytokines Stimulate CCL20 Expression in Keratinocytes In Vitro and In Vivo: Implications for Psoriasis Pathogenesis. *J Invest Dermatol.* 2009;129:2175-2183.
97. Hartwig T, Zwicky P, Schreiner B, et al. Regulatory T Cells Restrain Pathogenic T Helper Cells during Skin Inflammation. *Cell Rep.* 2018;25: 3564-3572.
98. Hawkes JE, Nguyen GH, Fujita M, et al. microARNs in Psoriasis. *J Invest Dermatol.* 2016;136:365-371.
99. Hayes J, Peruzzi PP, Lawler S, et al. MicroARNs in cancer: biomarkers, functions and therapy. *Trends Mol Med.* 2014;20:460-469.
100. Hedrick SM, Michelini RH, Doedens A, et al. FOXO transcription factors throughout T cell biology. *Nat Rev Immunol.* 2012;12:649-661.
101. Heegaard NHH, Carlsen AL, Skovgaard K, et al. Circulating extra-cellular microARN in systemic autoimmunity. *Exper Suppl (Basel).* 2015;106:171-195.
102. Hermann H, Runnel T, Aab A, et al. miR-146b Probably Assists miRNA-146a in the Suppression of Keratinocyte Proliferation and Inflammatory Responses in Psoriasis. *J Invest Dermatol.* 2017;137: 1945-1954.
103. Herrero-Moyano M, Pedraz J, Muñoz-Aceituno E, et al. Trough (C0) and 2 hour post-dose (C2) cyclosporine monitoring in patients with moderate-to-severe psoriasis". *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2019;33:e215-e217.

104. Hida S, Ogasawara K, Sato K, et al. CD8+ T cell-mediated skin disease in mice lacking IRF-2, the transcriptional attenuator of interferon-alpha/beta signaling. *Immunity*. 2000;13:643-655.
105. Hothorn T, Lausen B. On the exact distribution of maximally selected rank statistics. *Comput Stat Data Anal*. 2003;43:121-137.
106. Hu J, Zhai C, Hu J, et al. MiR-23a inhibited IL-17-mediated proinflammatory mediators expression via targeting IKK α in articular chondrocytes. *Int Immunopharm*. 2017;43:1-6.
107. Hugh JM, Weinberg JM. Update on the pathophysiology of psoriasis. *Cutis*. 2018;102:6–12.
108. Igaz P. *Circulating microARNs in Disease Diagnostics and Their Potential Biological Relevance*, Springer Basel, Basel, 2015.
109. Iwamoto S, Iwai S, Tsujiyama K, et al. TNF-alpha drives human CD14+ monocytes to differentiate into CD70+ dendritic cells evoking Th1 and Th17 responses. *J Immunol*. 2007;179:1449-1457.
110. Ji Y, He Y, Liu L, et al. MiRNA-26b regulates the expression of cyclooxygenase-2 in desferrioxamine-treated CNE cells. *FEBS Lett*. 2010;584:961-967.
111. Jiang S, Li C, Olive V, et al. Molecular dissection of the miR-17-92 cluster's critical dual roles in promoting Th1 responses and preventing inducible Treg differentiation. *Blood*. 2011;118:5487-5497.
112. Johansen C, Usher PA, Kjellerup RB, et al. Characterization of the interleukin-17 isoforms and receptors in lesional psoriatic skin. *Br J Dermatol*. 2009;160:319-324.

113. Joyce CE, Zhou X, Xia J, et al. Deep sequencing of small RNAs from human skin reveals major alterations in the psoriasis miRNAome. *Hum Mol Genet.* 2011;20:4025-4040.
114. Kagami S, Rizzo HL, Lee JJ et al. Circulating Th17, Th22, and Th1 cells are increased in psoriasis. *J Invest Dermatol.* 2010;130:1373-1383.
115. Kalali BN, Kollisch G, Mages J, et al. Double-stranded RNA induces an antiviral defense status in epidermal keratinocytes through TLR3-, PKR-, and MDA5/RIG-I-mediated differential signaling. *J Immunol.* 2008;181:2694-2704.
116. Kane D, Gogarty M, O’Leary J, et al. Reduction of synovial sublining layer inflammation and proinflammatory cytokine expression in psoriatic arthritis treated with methotrexate. *Arthritis Rheumat.* 2004;50:3286-3295.
117. Kapsenberg ML. Dendritic-cell control of pathogen driven T-cell polarization. *Nat Rev Immunol.* 2003;3:984-993.
118. Kastelan M, Massari LP, Brajac I. Apoptosis mediated by cytolytic molecules might be responsible for maintenance of psoriatic plaques. *Med Hypotheses.* 2006;67:336-337.
119. Keijsers R, Van Der Velden H, Van Erp P, et al. Balance of Treg vs. T-helper cells in the transition from symptomless to lesional psoriatic skin. *Br J Dermatol.* 2013;168:1294-1302.
120. Keller A, Leidinger P, Bauer A, et al. Toward the blood-borne miRNome of human diseases, *Nat Methods.* 2011;8:841-843.

121. Keller M, Ruegg A, Werner S, et al. Active caspase- 1 is a regulator of unconventional protein secretion. *Cell*. 2008;132:818-831.
122. Kopp F, Schnoedt M, Haase R, et al. De-targeting by miR-143 decreases unwanted transgene expression in non-tumorigenic cells. *Gene Ther*. 2013;20:1104-1109.
123. Kotb IS, Lewis BJ, Barker R, et al. Differential effects of phototherapy, adalimumab and betamethasone-calcipotriol on effector and regulatory T cells in psoriasis. *Br J Dermatol*. 2018;179:127-135.
124. Kovitwanichkanont T, Chong AH, Foley P. Beyond skin deep: addressing comorbidities in psoriasis. *Med J Aust*. 2020 Jun;212:528-534.
125. Krane JF, Gottlieb AB, Carter DM, et al. The insulin-like growth factor I receptor is overexpressed in psoriatic epidermis, but is differentially regulated from the epidermal growth factor receptor. *J Exp Med*. 1992;175:1081-1090.
126. Kryczek I, Bruce AT, Gudjonsson JE, et al. Induction of IL-17+ T cell trafficking and development by IFN-gamma: mechanism and pathological relevance in psoriasis. *J Immunol*. 2008;181:4733-4741.
127. Kuo G, Wu CY, Yang HY. MiR-17-92 cluster and immunity. *J Formos Med Assoc*. 2019;118:2-6.

128. Lajas C, Abasolo L, Bellajdel B, et al. Costs and predictors of costs in rheumatoid arthritis: a prevalence-based study. *Arthritis Rheum.* 2003;49:64-70.
129. Lande R, Gregorio J, Facchinetti V, et al. Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature.* 2007;449:564-9.
130. Landén NX, Meisgen F, Butler LM, et al. MicroARN-31 Is Overexpressed in Psoriasis and Modulates Inflammatory Cytokine and Chemokine Production in Keratinocytes via Targeting Serine/Threonine Kinase 40. *J Immunol.* 2012;190:678-688.
131. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V, The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell.* 1993;75:843-854,
132. León L, Abasolo L, Fernández-Gutierrez B, et al. Direct medical costs and their predictors in the EMAR-II cohort: “Variability in the management of rheumatoid arthritis and spondyloarthritis in Spain. *Reumatol Clin.* 2018;14:4-8.
133. Lerman JB, Joshi AA, Chaturvedi A, et al. Coronary plaque characterization in psoriasis reveals high-risk features that improve after treatment in a prospective observational study. *Circulation.* 2017;136:263-276.
134. Leuschner PJ, Ameres SL, Kueng S, et al. Cleavage of the siRNA passenger strand during RISC assembly in human cells. *EMBO Rep.* 2006;7:314-320.

135. Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, et al. Prediction of mammalian microARN targets. *Cell*. 2003;115:787-798.
136. Li B, Dewey CN. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics*. 2011;12:323.
137. Li B, Lei J, Yang L, et al. Dysregulation of Akt-FOXO1 Pathway Leads to Dysfunction of Regulatory T Cells in Patients with Psoriasis. *J Investig Dermatol*. 2019;139:2098-2107.
138. Li HP, Zeng XC, Zhang B, et al. miR-451 inhibits cell proliferation in human hepatocellular carcinoma through direct suppression of IKK- β . *Carcinogenesis*. 2013;34:2443-2451.
139. Little MC, Gawkrödger DJ, Mac Neil S. Differentiation of human keratinocytes is associated with a progressive loss of interferon- γ -induced intercellular adhesion molecule 1 expression. *Br J Dermatol*. 1996;135:24-31.
140. Liu D, Wang D, Xu Z, et al. Dysregulated expression of miR-101b and miR-26b lead to age-associated increase in LPS-induced COX-2 expression in murine macrophage, Age (Dordr). 2015;37:97.
141. Liu M, Wang Z, Yang S, et al. TNF- α is a novel target of miR-19a. *Int J Oncol*. 2011;38:1013-1022.
142. Liu Q, Wu DH, Han L, et al. Roles of microRNAs in psoriasis: Immunological functions and potential biomarkers. *Exp Dermatol*. 2017;26:359-367.
143. Liu R, Holik AZ, Su S, Jansz N, Chen K, Leong HS, et al. Why weight? Modelling sample and observational level variability

improves power in RNA-seq analyses. *Nucleic acids research*. 2015;43:e97

144. Liu SQ, Jiang S, Li C, et al. miR-17-92 cluster targets phosphatase and tensin homology and ikaros family zincfinger 4 to promote TH17-mediated inflammation. *J Biol Chem*. 2014;289:12446-12456.
145. Liu Y, Yang B, Zhou M et al. Memory IL-22-producing CD4(+) T cells specific for *Candida albicans* are present in humans. *Eur J Immunol*. 2009;39:1472-1479.
146. Liu YJ. IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu Rev Immunol*. 2005;23:275-306.
147. Løvendorf MB, Mitsui H, Zibert JR, et al. Laser capture microdissection followed by next-generation sequencing identifies disease-related microRNAs in psoriatic skin that reflect systemic microRNA changes in psoriasis. *Exp Dermatol*. 2015;24:187-193.
148. Løvendorf MB, Zibert JR, Gyldenløve M, et al. MicroRNA-223 and miR-143 are important systemic biomarkers for disease activity in psoriasis. *J Dermatol Sci*. 2014;75:133-139.
149. Lowes MA, Chamian F, Abello MV, et al. Increase in TNF-alpha and inducible nitric oxide synthase-expressing dendritic cells in psoriasis and reduction with efalizumab (anti-CD11a). *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102:19057-19062.

150. Lu LF, Boldin MP, Chaudhry A, et al. Function of miR-146a in Controlling Treg Cell-Mediated Regulation of Th1 Responses. *Cell*. 2010;142:914-929.
151. Mansouri B, Kivelevitch D, Natarajan B, et al. Comparison of coronary artery calcium scores between patients with psoriasis and type 2 diabetes. *JAMA Dermatol*. 2016;152:1244-1253.
152. Marabita F, De Candia P, Torri A, et al. Normalization of circulating microARN expression data obtained by quantitative real-time RT-PCR, *Brief Bioinform*. 2016;17:204-212.
153. Marble DJ, Gordon KB, Nickoloff BJ. Targeting TNF-alpha rapidly reduces density of dendritic cells and macrophages in psoriatic plaques with restoration of epidermal keratinocyte differentiation. *J Dermatol Sci*. 2007;48:87-101.
154. Martínez-Hernández R, de la Fuente H, Lamana A, et al. Utility of Circulating Serum miRNA Profiles to Evaluate the Potential Risk and Severity of Immune-Mediated Inflammatory Disorders. *J Autoimmun*. 2020;111:E102472.
155. Martínez-Hernández R, Sampedro-Núñez M, Serrano-Somavilla A, et al. A MicroARN signature for evaluation of risk and severity of auto-immune thyroid diseases. *J Clin Endocrinol Metabol*. 2018;103:1139-1150.
156. Masalha M, Sidi Y, Avni D. The contribution of feedback loops between miRNAs, cytokines and growth factors to the pathogenesis of psoriasis. *Exp Dermatol*. 2018;27:603-610.

157. Matranga C, Tomari Y, Shin C, et al. Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. *Cell*. 2005;123:607-620.
158. Matsushita S, Higashi T. Human Th17 Cell Clones and Natural Immune Responses. *Allergol Int*. 2008;57:135-140.
159. Matsuyama H, Suzuki HI, Nishimori H, et al. miR-135b mediates NPM-ALK-driven oncogenicity and renders IL-17-producing immunophenotype to anaplastic large cell lymphoma. *Blood*. 2011;118:6881-6892.
160. McGrogan A, Seaman HE, Wright JW, et al. The incidence of autoimmune thyroid disease: a systematic review of the literature. *Clin Endocrinol*. 2008;69:687-696.
161. McKenzie BS, Kastelein RA, Cua DJ. Understanding the IL-23- IL-17 immune pathway. *Trends Immunol*. 2006;27:17-23.
162. Mease P, Goffe BS. Diagnosis and treatment of psoriatic arthritis. *J Am Acad Dermatol*. 2005;52:1-19.
163. Meisgen F, Xu N, Wei T, et al. MiR-21 is up-regulated in psoriasis and suppresses T cell apoptosis. *Exp Dermatol*. 2012;21:312-314.
164. Mensà E, Recchioni R, Marcheselli F, et al. MiR-146a-5p correlates with clinical efficacy in patients with psoriasis treated with the tumour necrosis factor-alpha inhibitor adalimumab. *Br J Dermatol*. 2018;179:787-789.
165. Menssen A, Trommler P, Vollmer S, et al. Evidence for an antigen-specific cellular immune response in skin lesions of patients with psoriasis vulgaris. *J Immunol*. 1995;155:4078-83.

166. Michalak-Stoma A, Pietrzak A, Szepietowski JC, et al. Cytokine network in psoriasis revisited. *Eur Cytokine Netw.* 2011;22:160-8.
167. Michalek IM, Loring B, John SM. A systematic review of worldwide epidemiology of psoriasis. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2017;31:205-212.
168. Minami Y, Kono T, Miyazaki T, et al. The IL-2 receptor complex: its structure, function, and target genes. *Annu Rev Immunol.* 1993;11:245-267.
169. Miossec P, Korn T, Kuchroo VK. Interleukin-17 and type 17 helper T cells. *N Engl J Med.* 2009;361:888-898.
170. Miossec P. IL-17 and Th17 cells in human inflammatory diseases. *Microbes and Infection.* 2009;11:625-630.
171. Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Abbott AL, et al. Most *Caenorhabditis elegans* microARNs are Individually Not Essential for Development or Viability. *PLoS Genet.* 2007;3:e215.
172. Mizutani H, Ohmoto Y, Mizutani T, et al. Role of increased production of monocytes TNF- α , IL-1 β and IL-6 in psoriasis: relation to focal infection, disease activity and responses to treatments. *J Dermatol Sci.* 1997;14:145-153.
173. Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM, et al. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology.* 2012;142: 46-54.
174. Momi N, Kaur S, Rachagani S, et al. Smoking and microARN dysregulation: A cancerous combination. *Trends Mol Med.* 2013;20:36-47.

175. Muljo SA, Ansel KM, Kanellopoulou C, et al. Aberrant T cell differentiation in the absence of Dicer. *J Exp Med*. 2005;202:261-269.
176. Nakamura M, Toyoda M, Morohashi M. Pruritogenic mediators in psoriasis vulgaris: comparative evaluation of itch-associated cutaneous factors. *Br J Dermatol*. 2003;149:718-730.
177. Naldi L, Mercuri SR. Epidemiology of comorbidities in psoriasis. *Dermatol Ther*. 2010;23:114-8
178. Nemtsova MV, Zaletaev DV, Bure IV, et al. Epigenetic changes in the pathogenesis of rheumatoid arthritis, *Front Genet*. 2019;10:570.
179. Nestle FO, Conrad C, Tun-Kyi A, et al. Plasmacytoid predendritic cells initiate psoriasis through interferon-alpha production. *J Exp Med*. 2005;202:135-143.
180. Nestle FO, Kaplan DH, Barker J. Psoriasis. *N Engl J Med*. 2009. 30;361:496-509.
181. Nestle FO, Nickoloff BJ. From classical mouse models of psoriasis to a spontaneous xenograft model featuring use of AGR mice. *Ernst Schering Res Found Workshop*. 2005;50:203-12.
182. Nestle FO, Nickoloff BJ. Role of dendritic cells in benign and malignant lymphocytic infiltrates of the skin. *Dermatol Clin*. 1994;12:271-82.
183. Nickoloff BJ, Wrone-Smith T. Injection of pre-psoriatic skin with CD4+ T cells induces psoriasis. *Am J Pathol*. 1999;155:145-58.

184. Nickoloff BJ. Skin innate immune system in psoriasis: friend or foe? *J Clin Invest.* 1999;104:1161-4.
185. Nograles KE, Davidovici B, Krueger JG. New insights in the Immunologic Basis of Psoriasis. *Semin Cutan Med Surg.* 2010;29:3-9.
186. O'Connell RM, Baltimore D. MicroRNAs and hematopoietic cell development. *Curr Top Dev Biol.* 2012;99:145-174.
187. O'Connell RM, Rao DS, Baltimore D. MicroRNA regulation of inflammatory responses. *Annu Rev Immunol.* 2012;30:295-312.
188. O'Connell R, Rao DS, Chaudhuri AA, et al. Physiological and pathological roles for microARNs in the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2010;10:111-122.
189. Ou M, Zhang Y, Cui, S, et al. Upregulated Mir-9–5p Protects against Inflammatory Response in Rats with Deep Vein Thrombosis Via Inhibition of Nf-Kappab P50. *Inflammation.* 2019;42:1925-1938.
190. Ouyang W, Liao W, Luo CT, et al. Novel Foxo1-dependent transcriptional programs control T(reg) cell function. *Nature.* 2012;491:554-559.
191. Oyama R, Jinnin M, Kakimoto A, et al. Circulating microRNA associated with TNF- α signaling pathway in patients with plaque psoriasis. *J Dermatol Sci.* 2011;61:209-211.
192. Paller AS, Singh R, Cloutier M, et al. Prevalence of psoriasis in children and adolescents in the United States: a claims-based analysis. *J Drugs Dermatol.* 2018;17:187-194.

193. Park CY, Jeker LT, Carver-Moore K, et al. A Resource for the Conditional Ablation of microARNs in the Mouse. *Cell Rep.* 2012;1:385-391.
194. Passos ST, Silver JS, O'Hara AC, et al. IL-6 promotes NK cell production of IL-17 during toxoplasmosis. *J Immunol.* 2010;184:1776-1783.
195. Peltier HJ, Latham GJ. Normalization of microARN expression levels in quantitative RT-PCR assays: identification of suitable reference RNA targets in normal and cancerous human solid tissues. *RNA.* 2008;14:844-852.
196. Perera G, Di Meglio P, Nestle FO. Psoriasis. *Annu Rev Pathol.* 2012;7:385-422.
197. Philippe L, Alsaleh G, Suffert G, et al. TLR2 expression is regulated by microARN miR-19 in rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. *J Immunol.* 2012;188:454-461.
198. Pichiorri F, Suh SS, Ladetto M, et al. MicroARNs regulate critical genes associated with multiple myeloma pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008;105:12885-12890.
199. Pietrzak A, Zalewska A, Chodorowska G, et al. Genes and structure of selected cytokines involved in pathogenesis of psoriasis. *Folia Histochem Cytobiol.* 2008;46:11-21.
200. Pietrzak AT, Zalewska A, Chodorowska G, et al. Cytokines and anticytokines in psoriasis. *Clin Chim Acta.* 2008;394:7-21.

201. Pivarcsi A, Meisgen F, Xu N, et al. Changes in the level of serum microRNAs in patients with psoriasis after antitumour necrosis factor- α therapy. *Br J Dermatol.* 2013;169:563-570.
202. Prevoo ML, Van't Hof MA, Kuper HH, et al. Modified disease activity scores that include twenty-eight-jointcounts. Development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1995;38:44-48.
203. Prinz J, Braun-Falco O, Meurer M, et al. Chimaeric CD4 monoclonal antibody in treatment of generalised pustular psoriasis. *Lancet.* 1991;338:320-1.
204. Pulendran B. Immune activation: death, danger and dendritic cells. *Curr Biol.* 2004;14:30-32.
205. Qi HH, Ongusaha PP, Myllyharju J, et al. Prolyl 4-hydroxylation regulates Argonaute 2 stability. *Nature.* 2008;455:421-424.
206. Raaby L, Langkilde A, Kjellerup RB, et al. Changes in mRNA expression precede changes in microRNA expression in lesional psoriatic skin during treatment with adalimumab. *Br J Dermatol.* 2015;173:436-447.
207. Rawlings JS, Rosler KM, Harrison D. The JAK/STAT signaling pathway. *J Cell Sci.* 2004;117:1281-1283.
208. Rebora A. Cyclosporine A in psoriasis. *Clin Dermatol.* 1991;9:515-522.
209. Reich A, Szepietowski JC. Mediators of pruritus in psoriasis. *Mediators Inflamm.* 2007;2007:64727.

210. Richetta AG, Mattozzi C, Salvi M, et al. CD4+ CD25+ T-regulatory cells in psoriasis. Correlation between their numbers and biologics-induced clinical improvement. *Eur J Dermatol.* 2011;21:344-348.
211. Riol-Blanco L, Ordovas-Montanes J, Perro M, et al. Nociceptive sensory neurons drive interleukin-23-mediated psoriasiform skin inflammation. *Nature.* 2014;510:157-161.
212. Robin X, Turck N, Hainard A, et al. pROC: an open-source package for R and S+ to analyze and compare ROC curves. *BMC Bioinf.* 2011;12:77.
213. Rodríguez-Jiménez P, Chicharro P, Godoy A, et al. No evidence for induction of autoantibodies or autoimmunity during treatment of psoriasis with ustekinumab. *Br J Dermatol.* 2017;177:862-863.
214. Rodríguez-Jiménez P, Chicharro P, Llamas-Velasco M, et al. Thrombospondin-1/CD47 Interaction Regulates Th17 and Treg Differentiation in Psoriasis. *Front Immunol.* 2019;10:1268.
215. Ruckert R, Asadullah K, Seifert M, et al. Budagian VM, Arnold R, Trombotto C, Paus R, Bulfone-Paus S. Inhibition of keratinocyte apoptosis by IL-15: a new parameter in the pathogenesis of psoriasis? *J Immunol.* 2000;165:2240-2250.
216. Sabat R, Wolk K. Research in practice: IL-22 and IL-20: significance for epithelial homeostasis and psoriasis pathogenesis. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2011;9:518-23
217. Salvi V, Gianello V, Tiberio L, et al. Cytokine targeting by miRNAs in autoimmune diseases. *Front Immunol.* 2019;10:15.

218. Schaefer JS, Attumi T, Opekun AR, et al. MicroARN signatures differentiate Crohn's disease from ulcerative colitis. *BMC Immunol.* 2015;16:5.
219. Schön MP, Boehncke WH. Psoriasis. *N Engl J Med.* 2005;352:1899-912.
220. Schottelius AJG, Moldawer LL, Dinarello CA, et al. Biology of tumor necrosis factor- α implications for psoriasis. *Exp Dermatol.* 2004;13:193-222.
221. Shao Y, Chong L, Lin P, et al. MicroARN-133a alleviates airway remodeling in asthma through PI3K/AKT/mTOR signaling pathway by targeting IGF1R. *J Cell Physiol.* 2018;234:4068-4080.
222. Shimizu T, Kamata M, Fukaya S, et al. Anti-IL-17A and IL-23p19 antibodies but not anti-TNF α antibody induce expansion of regulatory T cells and restoration of their suppressive function in imiquimod-induced psoriasiform dermatitis. *J Dermatol Sci.* 2019;95:90-98.
223. Shrestha S, Yang K, Guy C, et al. Treg cells require the phosphatase PTEN to restrain TH1 and TFH cell responses. *Nat Immunol.* 2015;16:178-187.
224. Siegal FP, Kadowaki N, Shodell M, et al. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science.* 1999;284:1835-1837.
225. Simon LM, Edelstein LC, Nagalla S, et al. Human platelet microARN-mRNA networks associated with age and gender revealed by integrated plateletomics. *Blood.* 2014;123:e37-e45.

226. Singhvi G, Manchanda P, Krishna Rapalli V, et al. MicroRNAs as biological regulators in skin disorders. *Biomed Pharmacother.* 2018;108:996-1004.
227. Sousa CR. Essay—dendritic cells in a mature age. *Nat Rev Immunol.* 2006;6:476-483.
228. Srivastava A, Karlsson M, Marionnet C, et al. Identification of chronological and photoageing-associated microARNs in human skin. *Sci Rep.* 2018;8:12990.
229. Srivastava A, Nikamo P, Lohcharoenkal W, et al. MicroARN-146a suppresses IL-17-mediated skin inflammation and is genetically associated with psoriasis. *J Allergy Clin Immunol.* 2017;139:550-561.
230. Steinman RM, Pope M. Exploiting dendritic cells to improve vaccine efficacy. *J Clin Invest.* 2002;109:1519-1526.
231. Sugiyama H, Gyulai R, Toichi E, et al. Dysfunctional blood and target tissue CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells in psoriasis: Mechanism underlying unrestrained pathogenic effector T cell proliferation. *J Immunol.* 2005;174:164-173.
232. Sun J, Yan P, Chen Y, et al. MicroARN-26b inhibits cell proliferation and cytokine secretion in human RASF cells via the Wnt/GSK-3 β / β -catenin pathway. *Diagn Pathol.* 2015;10:72.
233. Suzuki HI, Yamagata K, Sugimoto K, et al. Modulation of microARN processing by p53. *Nature.* 2009;460:529-533.
234. Swindell WR, Johnston A, Voorhees JJ, et al. Dissecting the psoriasis transcriptome: inflammatory and cytokine-driven gene

- expression in lesions from 163 patients. *BMC Genomics*. 2013;14:527.
235. Swindell WR, Remmer HA, Sarkar MK, et al. Proteogenomic analysis of psoriasis reveals discordant and concordant changes in mRNA and protein abundance. *Genome Med*. 2015;7:86.
 236. Szegedi A, Aleksza M, Gonda, A et al. Elevated rate of Thelper1 (Th1) lymphocytes and serum IFN- γ levels in psoriatic patients. *Immunol Lett*. 2003;86:277-280.
 237. Teruel R, Pérez-Sánchez C, Corral J, et al. Identification of miRNAs as potential modulators of tissue factor expression in patients with systemic lupus erythematosus and antiphospholipid syndrome: tissue factor regulation by miRNAs. *J Thromb Haemostasis*. 2011;9:1985-1992.
 238. Theofilopoulos AN, Kono DH, Baccala R. The multiple pathways to autoimmunity. *Nat Immunol*. 2017;18:716-724.
 239. Tonel G, Conrad C, Laggner U, et al. Cutting edge: a critical functional role for IL-23 in Psoriasis. *J Immunol*. 2010;185:5688-5691.
 240. Torri A, Carpi N, Bulgheroni E, et al. Extracellular MicroARN Signature of Human Helper T Cell Subsets in Health and Autoimmunity. *J Biol Chem*. 2017;292:2903-2915.
 241. Trifari S, Kaplan CD, Tran EH et al. Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from Th-17, Th1 and Th2 cells. *Nat Immunol*. 2009;10:864-871.

242. Tsai ZY, Singh S, Yu SL, et al. Identification of microARNs regulated by activin A in human embryonic stem cells. *J Cell Biochem.* 2010;109:93-102.
243. Tsitsiou E, Lindsay MA. MicroRNAs and the immune response. *Curr Opin Pharmacol.* 2009;9:514–520.
244. Umezu T, Tadokoro H, Azuma K, et al. Exosomal miR-135b shed from hypoxic multiple myeloma cells enhances angiogenesis by targeting factor-inhibiting HIF-1. *Blood.* 2014;124:3748-3757.
245. Uyemura K, Yamamura M, Fivenson DF, et al. The cytokine network in lesional and lesion-free psoriatic skin is characterized by a T- helper type 1 cell-mediated response. *J Invest Dermatol.* 1993;101:701-705.
246. Van der Fits L, Mourits S, Voerman JS, et al. Imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice is mediated via the IL-23/IL-17 axis. *J Immunol.* 2009;182:5836-5845.
247. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 2002;3:research0034.
248. Vidigal JA, Ventura A. The biological functions of miRNAs: Lessons from in vivo studies. *Trends Cell Biol.* 2014;25:137-147.
249. Villadsen LS, Schuurman J, Beurskens F, et al. Resolution of psoriasis upon blockade of IL- 15 biological activity in a xenograft mouse model. *J Clin Invest.* 2003;112:1571-1580.

250. Von Csiky-Sessoms S, Lebwohl M. What's New in Psoriasis. *Dermatol Clin*. 2019;37:129-136.
251. Wang D, Eiz-Vesper B, Zeitvogel J, et al. Human keratinocytes release high levels of inducible heat shock protein 70 that enhances peptide uptake. *Exp Dermatol*. 2011;20:637-41.
252. Wang J, Chen J, Sen S. MicroARN as biomarkers and diagnostics: MicroARNs as biomarkers for diagnostics. *J Cell Physiol*. 2016;231:25-30.
253. Wang S, Wan X, Ruan Q. The MicroARN-21 in autoimmune diseases. *Int J Math Stat*. 2016;17:864.
254. Wang Z, Zhou H, Zheng H, et al. Autophagy-Based Unconventional Secretion of Hmgb1 by Keratinocytes Plays a Pivotal Role in Psoriatic Skin inflammation. *Autophagy*. 2020;16:1–24.
255. WareCF. The TNF superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2003;14:181-184.
256. Wiesen JL, Tomasi TB. Dicer is regulated by cellular stresses and interferons. *Mol Immunol*. 2009;46:1222-1228.
257. Wilson NJ, Boniface K, Chan JR, et al. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol*. 2007; 8:950-957.
258. Wolk K, Haugen HS, Xu W, et al. IL-22 and IL-20 are key mediators of the epidermal alterations in psoriasis while IL-17 and IFN- gamma are not. *J Mol Med*. 2009;87: 523-536.

259. Wolk K, Witte E, Warszawska K, et al. The Th17 cytokine IL-22 induces IL-20 production in keratinocytes: a novel immunological cascade with potential relevance in psoriasis. *Eur J Immunol.* 2009;39:3570-3581.
260. Wolk K, Witte K, Witte E, et al. Maturing dendritic cells are an important source of IL-29 and IL-20 that may cooperatively increase the innate immunity of keratinocytes. *J Leukoc Biol.* 2008;83:1181-1193.
261. Wraight CJ, White PJ, McKean SC, et al. Reversal of epidermal hyperproliferation in psoriasis by insulin-like growth factor I receptor antisense oligonucleotides. *Nat Biotechnol.* 2000;18:521-526.
262. Xu N, Meisgen F, Butler LM, et al. MicroRNA-31 is overexpressed in psoriasis and modulates inflammatory cytokine and chemokine production in keratinocytes via targeting serine/threonine kinase 40. *J Immunol.* 2013;190:678-88.
263. Yan J, Song J, Qiao M, et al. Long noncoding RNA expression profile and functional analysis in psoriasis. *Mol Med Rep.* 2019;19:3421–3430.
264. Yan S, Xu Z, Lou F, et al. NF- κ B-induced microARN-31 promotes epidermal hyperplasia by repressing protein phosphatase 6 in psoriasis. *Nat Commun.* 2015;6:7652.
265. Ye XM, Zhu H, Bai WD, et al. Epigenetic silencing of miR-375 induces trastuzumab resistance in HER2-positive breast cancer by targeting IGF1R. *BMC Cancer.* 2014;14:134.

266. Yi R, Poy MN, Stoffel M, et al. A skin microRNA promotes differentiation by repressing stemness. *Nature*. 2008;452:225-229.
267. Yin X, Wang JQ, Yan SY. Reduced miR-26a and miR-26b expression contributes to the pathogenesis of osteoarthritis via the promotion of p65 translocation. *Mol Med Rep*. 2017;15:551-558.
268. Yue P, Jing L, Zhao X, et al. Down-Regulation of Taurine-up-Regulated Gene 1 Attenuates Inflammation by Sponging Mir-9-5p Via Targeting Nf-Kappab1/P50 in Multiple Sclerosis. *Life Sci*. 2019;233:116731.
269. Zaba LC, Cardinale I, Gilleaudeau P, et al. Amelioration of epidermal hyperplasia by TNF inhibition is associated with reduced Th17 responses. *J Exp Med*. 2007;204:3183-3194.
270. Zaba LC, Fuentes-Duculan J, Eungdamrong NJ, et al. Psoriasis is characterized by accumulation of immunostimulatory and Th1/Th17 cell-polarizing myeloid dendritic cells. *J Invest Dermatol*. 2009;129:79-88.
271. Zelante T. IL-23 and the Th17 pathway promote inflammation and impair antifungal immune resistance. *Eur J Immunol*. 2007;37:2695-2706.
272. Zhang P, Su Y, Lu Q. Epigenetics and psoriasis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2012;26:399-403.
273. Zhang W, Yi X, An Y, et al. MicroRNA-17-92 cluster promotes the proliferation and the chemokine production of keratinocytes: implication for the pathogenesis of psoriasis. *Cell Death Dis*. 2018;9:567.

274. Zhang W, Yi X, Guo S, et al. A single-nucleotide polymorphism of miR-146a and psoriasis: An association and functional study. *J Cell Mol Med*. 2014;18:2225-2234.
275. Zhao M, Wang LT, Liang GP, et al. Up-regulation of microRNA-210 induces immune dysfunction via targeting FOXP3 in CD4(+) T cells of psoriasis vulgaris. *Clin Immunol*. 2014;150:22-30.
276. Zheng Y, Danilenko DM, Valdez P, et al. Interleukin-22, a Th17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis. *Nature*. 2007;445:648-651.
277. Zhou L, Qi RQ, Liu M, et al. MicroRNA miR-17-92 cluster is highly expressed in epidermal Langerhans cells but not required for its development. *Genes Immun*. 2014;15:57-61.
278. Zhou X, Krueger JG, Kao MC, et al. Novel mechanisms of T-cell and dendritic cell activation revealed by profiling of psoriasis on the 63,100-element oligonucleotide array. *Physiol Genomics*. 2003;13:69-78.
279. Zhu QY, Liu Q, Chen JX, et al. MicroARN-101 targets MAPKphosphatase-1 to regulate the activation of MAPKs in macrophages. *J Immunol*. 2010;185:7435-7442.
280. Zibert JR, Løvendorf MB, Litman T, et al. MicroRNAs and potential target interactions in psoriasis. *J Dermatol Sci*. 2010;58:177-185.

10. Anexos.

10.1 Índice de acrónimos:

- ADN (DNA): Ácido desoxirribonucleico.
- ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario.
- Ag: Antígenos.
- AITD: Enfermedad tiroidea autoinmune.
- APs (PsA): Artritis psoriásica.
- AR: Artritis reumatoide.
- ARN (RNA): Ácido ribonucleico.
- ARNm (RNAm): Ácido ribonucleico mensajero.
- ARN Inc (lncRNA): Ácido ribonucleico largo no codificante.
- ARNnc (ncRNA): Ácido ribonucleico no codificante.
- AUC: Área/s bajo la curva.
- BMI (IMC): Índice de masa corporal.
- BSA: área/s de superficie corporal.
- CPA: Células presentadoras de antígeno.
- CPM: Cuenta/s por millón.
- Ct: Umbral del ciclo (*Cycle threshold*).
- CU: Colitis ulcerosa.
- DC: Célula dendrítica.
- DCm: Célula dendrítica mieloide.
- DCp: Célula dendrítica plasmocitoide.

- DM: Diabetes mellitus.
- DS: Desviación estándar.
- EB: Enfermedad de Behçet.
- EC: Enfermedad de Crohn.
- EG: Enfermedad de Graves
- EGF: Factor de crecimiento epidérmico.
- EII: Enfermedad inflamatoria intestinal.
- EM: Esclerosis múltiple.
- FGFR: Receptor del factor de crecimiento.
- GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.
- GLM: Modelo lineal generalizado (*Generalized lineal model*).
- HSP: Proteínas de shock térmico.
- IFN- α : Interferón alfa.
- IFN- γ : Interferón gamma.
- IGFR1: Receptor del factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1.
- IL: Interleucina o interleuquina.
- IMIDs: Enfermedades inflamatorias mediadas por la respuesta inmune (*Immune-mediated inflammatory disorders*).
- iNKT: Células T *Natural Killer* invariantes.
- iNOS: Óxido nítrico sintasa inducible.
- JAK: Vía de la quinasa *Janus*.
- LAK: Células *killer* activadas por linfoquinas.
- LC: Células de Langerhans.
- LES: Lupus sistémico eritematoso.

- MAPK: Protein-quinasas activadas por mitógenos.
- MCP: Proteína quimiotáctica de monocitos.
- MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad.
- miRNA/hsa-mir (microARN): micro-ácido desoxirribonucleico.
- NGS: Secuenciación masiva de nueva generación (*Next generation sequencing*).
- NIgA: Negropatía por IgA.
- NK: Células T *Natural Killer*.
- NRQ: Cantidad relativa normalizada (*Normalised relative quantity*).
- OG: Oftalmopatía de Graves.
- OR: Razón de probabilidades (*Odds ratio*).
- PAMP: Patrón molecular asociado a patógeno.
- PASI: Índice de Severidad y Área de Psoriasis (*Psoriasis Area and Severity Index*).
- Pb: Par/es de bases.
- PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase chain reaction*).
- PGE2: Prostaglandina E2.
- PRR: Receptores de reconocimiento de patrones/antígenos.
- PTGS2: Prostaglandina-endoperóxido sintasa 2.
- qRT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa, en tiempo real o cuantitativa.
- RHD: Cardiopatía reumatológica.

- ROC: Característica/s operativa/s del receptor (*Receiver Operating Characteristic*).
- RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa.
- RUNX3: Factor de transcripción 3 relacionado con runt.
- SAF: Síndrome antifosfolípido.
- SEM: Error estándar de la media.
- SOCS: Supresor de señalización de citoquina.
- SS: Síndrome de Sjögren.
- STAT: Transductor de señales y activador de la transcripción (*Signal transducer and activator of transcription proteins*).
- TCR: Receptor de células T.
- TGF: Factor de crecimiento de transformación.
- Th: Célula T cooperadora.
- TH: Tiroiditis de Hashimoto.
- TIL: Linfocitos infiltrantes de tumores.
- TLR: Receptor *Toll-like*.
- TMM: Media truncada de M-valores (*Trimmed mean of M-values*).
- TNF α : Factor de necrosis tumoral alfa (*Tumoral necrosis factor alpha*).
- TPI: Trombocitopenia inmune.
- Treg: Células T reguladoras.

10.2. Pies de figuras y tablas.

Figura 1: Manifestaciones clínicas de la psoriasis – Página 19.

Figura 2: Características histopatológicas de la psoriasis – Página 21.

Figura 3: Células clave y mediadores en la transición de la inmunidad innata a la adaptativa en la psoriasis – Página 23.

Figura 4: Fisiopatología de la psoriasis y dianas específicas de terapias biológicas – Página 25.

Figura 5: Interacción entre queratinocitos y mediadores inmunitarios – Página 28.

Figura 6: Inmunopatogenia de la psoriasis. Interacciones de poblaciones celulares – Página 37.

Figura 7: Diferenciación de células T naïve (Th0) en células Th1, Th17, Th22, Th2 y T reguladoras – Página 40.

Figura 8: Modelo de biogénesis de microARNs y regulación postranscripcional de genes – Página 57.

Figura 9: Enfermedades dermatológicas vinculadas con alteraciones en los microARNs – Página 58.

Figura 10: Mecanismo de acción de miR-138 y miR-210 en psoriasis – Página 62.

Figura 11: Papeles de los microARNs en la modulación de los distintos mecanismos de la inmunopatogenia de la psoriasis – Página 67.

Figura 12: Dianas específicas de las distintas terapias biológicas disponibles en psoriasis – Página 77.

Figura 13: Expresión diferencial de microARNs conocidos en piel sana (Healthy, H), psoriásica no lesional (Non-lesion, NL) y psoriásica lesional (Lesion, L) – 86.

Figura 14: Efecto de las variables demográficas y clínicas en la expresión de microARNs – Página 92.

Figura 15: Análisis cuantitativo por PCR de microARNs en piel psoriásica lesional y no lesional – Página 93.

Figura 16: Expresión de IL-12b y S100A9 en muestras de piel como marcadores inflamatorios – Página 95.

Figura 17: Niveles de microARNs en piel lesional antes del inicio del tratamiento y en lesiones residuales después de 3 meses de tratamiento – Página 97.

Figura 18: Relación entre miR-135b y la actividad de la enfermedad – Página 98.

Figura 19: Relación entre miR-135b y S100A9 – Página 99.

Figura 20: Red de interacción de microARNs y ARNm diana asociados con la psoriasis – Página 104.

Figura 21: Red de interacción de microARNs y ARNm diana asociados con la respuesta inmune y la angiogénesis – Página 106.

Figura 22: Valores de Ct (umbral de ciclo) de los microARNs analizados en muestras de suero – Página 116.

Figura 23: Asociación entre niveles séricos de microARNs y variables clínicas y demográficas en controles sanos – Página 120.

Figura 24: Mapa de correlación entre microARNs en IMIDs (enfermedades inflamatorias mediadas por la respuesta inmune) – Página 122.

Figura 25: MicroARNs séricos asociados con IMIDs (enfermedades inflamatorias mediadas por la respuesta inmune) [1] – Página 124.

Figura 26: MicroARNs séricos asociados con IMIDs (enfermedades inflamatorias mediadas por la respuesta inmune) [2] – Página 127.

Figura 27: MicroARNs séricos asociados a gravedad de IMIDs (enfermedades inflamatorias mediadas por la respuesta inmune) [1] – Página 129.

Figura 28: MicroARNs séricos asociados a gravedad de IMIDs (enfermedades inflamatorias mediadas por la respuesta inmune) [2] – Página 131.

Figura 29: MicroARNs séricos asociados con psoriasis – Página 135.

Figura 30: Expresión de miR-27a y psoriasis – Página 136.

Figura 31: MicroARNs séricos y gravedad de psoriasis – Página 137.

Tabla 1: Influencia de las citoquinas sobre los principales fenómenos fisiopatológicos de la psoriasis – Página 39.

Tabla 2: Métodos actuales para el estudio de microARNs – Página 59.

Tabla 3: Terapias biológicas actuales en psoriasis – Página 76.

Tabla 4: Expresión diferencial de microARNs en piel sana (H), psoriásica no lesional (NL) y psoriásica lesional (L) – Página 88.

Tabla 5: MicroARNs seleccionados mediante secuenciación de nueva generación (NGS) – Página 89.

Tabla 6: Características demográficas y clínicas de la cohorte de 44 pacientes – Página 90.

Tabla 7: PASI tras tres meses de tratamiento con terapia biológica en los pacientes con segunda biopsia (n = 15) – Página 95.

Tabla 8: Análisis de regresión múltiple para el PASI (Índice de área y severidad de la psoriasis) – Página 100.

Tabla 9: Regresión logística univariante aplicada a variables clínicas relevantes y mejoría clínica mediante PASI (Índice de Severidad y Área de Psoriasis) – Página 102.

Tabla 10: Regresión logística multivariable respecto a mejoría clínica mediante PASI (Índice de Severidad y Área de Psoriasis) a los 3 meses de tratamiento – Página 102.

Tabla 11: Características clínicas de los pacientes con IMIDs (enfermedades inflamatorias mediadas por la respuesta inmune) clasificados por gravedad y de los controles – Página 109.

Tabla 12: Características clínicas de los pacientes con IMIDs (enfermedades inflamatorias mediadas por la respuesta inmune) clasificados por gravedad – Página 110.

Tabla 13: Resumen de las puntuaciones de estabilidad (SSS) de los microARNs clasificados en orden ascendente según su variabilidad (una SSS más baja significa una mayor estabilidad) – Página 115.

Tabla 14: Diferencias en niveles de microARNs en suero entre pacientes con IMIDs (enfermedades inflamatorias mediadas por la respuesta inmune) y controles sanos – Página 125.

Tabla 15: Diferencias en niveles de microARNs en suero entre pacientes con IMIDs (enfermedades inflamatorias mediadas por la respuesta inmune) leves o graves – Página 130.

Tabla Suplementaria 1: Principales bases de datos y portales en red disponibles para la búsqueda de microARNs – Página 216.

Tabla Suplementaria 2: MicroARNs más relevantes alterados en la psoriasis, sus dianas y funciones biológicas – Página 217.

Tabla Suplementaria 3: MicroARNs regulados a la baja en psoriasis [Ghafouri-Fard et al., 2020] – Página 218.

Tabla Suplementaria 4: MicroARNs regulados al alza en psoriasis [Ghafouri-Fard et al., 2020] – Página 219.

Tabla Suplementaria 5: Selección de microARNs para el estudio sérico en IMIDs (enfermedades inflamatorias mediadas por la respuesta inmune) – Página 223.

Figura Suplementaria 1: Hoja de cálculo del índice de severidad y área de la psoriasis (PASI) – Página 224.

10.3. Consentimientos informados.

CONSENTIMIENTO DE PARTICIPACIÓN 1 (Pacientes).

Línea de investigación: “Identificación de microARNs en piel como biomarcadores de gravedad y respuesta al tratamiento en pacientes con Psoriasis.”.

Le proponemos participar en un proyecto de investigación que estamos realizando varios Servicios de Dermatología de la Comunidad de Madrid sobre la enfermedad que usted padece, la psoriasis. El objetivo de este proyecto es buscar una relación entre la expresión de microARNs que tiene cada persona y la forma de responder a los fármacos. Los microARNs son un tipo de RNA pequeños que regulan la expresión de genes, la desregulación de la expresión de este material genético se ha asociado a diferentes enfermedades incluidas las enfermedades autoinmunes. Nuestro objetivo es determinar si los microARNs pueden funcionar como un biomarcador que permita predecir la respuesta al tratamiento farmacológico.

Se le realizarán 2 biopsias al inicio del estudio una de la placa psoriásica y la otra de piel no afecta de 4 mm cada una. Se le realizará una biopsia más de 2 mm a las 12-16 semanas de iniciado el tratamiento. La muestra será codificada (identificada con un número sin que figuren datos personales). Además, se van a recoger datos de su historia clínica como edad, sexo y fármacos que ha recibido y cómo ha respondido a ellos. Sus datos codificados serán incorporados a un archivo informático radicado en estos Hospitales y analizados posteriormente.

La participación en este estudio no supone ningún riesgo para usted porque no se va a modificar su asistencia médica, y tampoco es previsible que le proporcione ningún beneficio concreto. En el momento actual los marcadores analizados en este estudio no se han relacionado con el riesgo de desarrollar enfermedades, pero no sabemos si en el futuro se puede encontrar alguna relación.

Los resultados obtenidos no serán útiles para un paciente concreto en la actualidad, ni le proporcionarán ningún beneficio adicional; únicamente aumentará nuestro conocimiento sobre su enfermedad y los factores que determinan una mejor o peor respuesta a los diversos tratamientos, por lo que quizás pueda ser de utilidad para otros pacientes con psoriasis en el futuro.

Si los resultados obtenidos tuviesen trascendencia para usted o sus familiares, le informaremos de los mismos, proporcionándole el consejo genético adecuado, según lo establecido en el artículo 47 de la Ley de Investigación Biomédica 15/2007. Sería conveniente que en este caso usted informe a sus familiares.

En todo momento se respetará su confidencialidad de acuerdo a la Ley Orgánica de Protección de Datos 15/1999. Aunque los resultados sean publicados, no se revelará su identidad. Debe usted saber que también se respetará su derecho a conocer los resultados o a decidir que no se le comuniquen los datos obtenidos. No obstante, cuando esta información, según criterio del médico responsable, sea necesaria para evitar un grave perjuicio para su salud o la de sus familiares biológicos, se informará a un familiar próximo o a un representante, previa consulta con el comité de ética. En todo caso, la comunicación se limitará exclusivamente a los datos necesarios para esta finalidad.

Finalmente, debe saber que usted es libre de decidir si quiere participar en este estudio, sin que se vea perjudicada su atención médica por ello. Además, podrá retirar su consentimiento en cualquier momento sin necesidad de tener que dar explicaciones y sin ningún perjuicio en su atención sanitaria. Si decide retirar su consentimiento después de habernos facilitado la muestra de sangre, tiene que avisarnos para que su muestra sea destruida. No obstante, no se destruirán los datos que hayan sido obtenidos hasta entonces.

Si tiene alguna duda sobre la información que acaba de leer, pregunte al médico que le ha facilitado esta hoja. Si en el futuro surge algún problema relacionado con el estudio, puede contactar con su médico o con los

investigadores del estudio (Dr. Esteban Daudén, Dra. Mar Llamas, Dr. Chicharro del Servicio de Dermatología, teléfono 915202433).

Yo en calidad de
(paciente/otra relación con el paciente/testigo)

de (nombre y apellidos del paciente en caso de que no lo firme
él/ella)..... declaro
que he leído o le he leído al paciente la hoja de información del estudio.

1. Entiendo que la realización de la exploración clínica realizada, la toma de fotografías para la documentación cutánea y la realización de biopsias cutáneas en los casos en que proceda, servirá al doble objetivo de valoración y tratamiento en práctica clínica habitual así como para el posterior estudio de los datos derivados de la mismas con la finalidad de conocer la implicación de los microARNs en los procesos de la patogénesis la psoriasis.

2. Entiendo que la aplicación de los datos que puedan encontrarse en la realización de este estudio pueden no ser directamente aplicables a mi caso particular.

3. Entiendo que mi participación es voluntaria y puedo revocar la autorización de participar en el estudio.

4. Respecto a la realización de la biopsia cutánea, me han sido explicados sus riesgos generales y personalizados y he firmado un consentimiento informado de la misma, que al igual que el presente puedo revocar sin necesidad de dar explicaciones acerca de mi actitud.

Nombre del participante:

Firma y Fecha

Nombre del investigador:

Firma y Fecha

CONSENTIMIENTO DE PARTICIPACION 2 (Controles).

Nos dirigimos a usted para informarle sobre un estudio de investigación en el que se le invita a participar. El estudio ha sido aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica correspondiente y la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios, de acuerdo a la legislación vigente, el Real Decreto 223/2004, de 6 de febrero, por el que se regulan los ensayos clínicos con medicamentos.

Nuestra intención es tan solo que usted reciba la información correcta y suficiente para que pueda evaluar y juzgar si quiere o no participar en este estudio. Para ello lea esta hoja informativa con atención y nosotros le aclararemos las dudas que le puedan surgir después de la explicación. Además, puede consultar con las personas que considere oportuno.

PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA

Debe saber que su participación en este estudio es voluntaria y que puede decidir no participar o cambiar su decisión y retirar el consentimiento en cualquier momento, sin que por ello se altere la relación con su médico ni se produzca perjuicio alguno en su tratamiento.

OBJETIVOS DEL ESTUDIO.

Los microARNs son un tipo de RNA pequeños que regulan la expresión de genes, la disregulación de la expresión de este material genético se ha asociado a diferentes enfermedades incluidas las enfermedades autoinmunes. Nuestro objetivo es determinar si los microARNs pueden funcionar como un biomarcador que permita predecir la respuesta al tratamiento farmacológico en pacientes con psoriasis.

Procedimientos

Si acepto participar en este estudio, como resultado de mi participación:

-Se me requerirá que lea y firme este consentimiento tras responder a todas mis dudas.

-Se me realizará una biopsia de 4mm en una zona de piel sana, no expuesta al sol, sin afectación estética relevante. La muestra será codificada (identificada con un número sin que figuren datos personales). Además, se van a recoger datos de su historia clínica como edad, sexo y fármacos que ha recibido y cómo ha respondido a ellos. Sus datos codificados serán incorporados a un archivo informático radicado en estos Hospitales y analizados posteriormente.

- Los datos y muestras biológicas obtenidos serán empleadas con doble finalidad; diagnóstica y de investigación, sin que esta segunda finalidad repercuta en el tipo o frecuencia de seguimiento del paciente.

DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO SOBRE LA PROTECCIÓN DE DATOS

Estoy conforme con la participación en el estudio mencionado anteriormente. Me han sido comunicados los objetivos de dicho estudio y estoy de acuerdo en que dentro del marco del estudio científico mis datos personales y médicos sean procesados, almacenados y valorados científicamente, de forma anónima, por el personal del Servicio de Dermatología del Hospital Universitario De La Princesa. El tratamiento, la comunicación y la cesión de los datos de carácter personal de todos los sujetos participantes se ajustará a lo dispuesto en la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre de protección de datos de carácter personal. De acuerdo a lo que establece la legislación mencionada, usted puede ejercer los derechos de acceso, modificación, oposición y cancelación de datos, para lo cual deberá dirigirse a su médico del estudio.

Los datos recogidos para el estudio estarán identificados mediante un código y solo su médico del estudio/colaboradores podrá relacionar dichos datos con usted y con su historia clínica. Por lo tanto, su identidad no será revelada a persona alguna.

Sólo se transmitirán a terceros y a otros países los datos recogidos para el estudio que en ningún caso contendrán información que le pueda identificar directamente, como nombre y apellidos, iniciales, dirección, nº de la seguridad social, etc. En el caso de que se produzca esta cesión, será

para los mismos fines del estudio descrito y garantizando la confidencialidad como mínimo con el nivel de protección de la legislación vigente en nuestro país.

El acceso a su información personal quedará restringido al médico del estudio/colaboradores, autoridades sanitarias (Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios), al Comité Ético de Investigación Clínica y personal autorizado por el promotor, cuando lo precisen para comprobar los datos y procedimientos del estudio, pero siempre manteniendo la confidencialidad de los mismos de acuerdo a la legislación vigente.

OTRA INFORMACIÓN RELEVANTE.

Este proyecto no está financiado y soy consciente de que no recibiré ninguna remuneración con mi participación.

Al firmar la hoja de consentimiento adjunta, usted se compromete a cumplir con los procedimientos del estudio que se le han expuesto.

Si usted decide retirar el consentimiento para participar en este estudio, ningún dato nuevo será añadido a la base de datos y, puede exigir la destrucción de todas las muestras identificables previamente retenidas para evitar la realización de nuevos análisis.

Lugar, fecha y firma del paciente

Firma del facultativo

Ante cualquier problema o efecto secundario podrán contactar en horario de mañana con la Dra. Llamas Velasco, el Dr. Chicharro o el Dr. Daudén Tello a través del 9152010330.

CONSENTIMIENTO DE PARTICIPACIÓN 3 (Pacientes).

Línea de investigación: “Identificación de microARNs en suero como biomarcadores de riesgo y/o gravedad de psoriasis”.

Le proponemos participar en un proyecto de investigación que estamos realizando varios Servicios de Dermatología de la Comunidad de Madrid sobre la enfermedad que usted padece, la psoriasis. El objetivo de este proyecto es buscar una relación entre la expresión de microARNs que tiene cada persona y la gravedad de la psoriasis. Los microARNs son un tipo de RNA pequeños que regulan la expresión de genes, la desregulación de la expresión de este material genético se ha asociado a diferentes enfermedades incluidas las enfermedades autoinmunes. Nuestro objetivo es determinar si los microARNs pueden funcionar como un biomarcador que permita predecir el desarrollo de psoriasis y, en ese caso, la gravedad de ésta.

Si decide participar se le extraerá una muestra de sangre al inicio del estudio de unos 10 ml que se hará coincidir con otras extracciones para no tener que pincharle simplemente por este estudio. Además, se van a recoger datos de su historia clínica como edad, sexo y fármacos que ha recibido y cómo ha respondido a ellos. Sus datos codificados serán incorporados a un archivo informático radicado en estos Hospitales y analizados posteriormente.

La participación en este estudio no supone ningún riesgo para usted porque no se va a modificar su asistencia médica, y tampoco es previsible que le proporcione ningún beneficio concreto. En el momento actual los marcadores analizados en este estudio no se han relacionado con el riesgo de desarrollar enfermedades, pero no sabemos si en el futuro se puede encontrar alguna relación.

Los resultados obtenidos no serán útiles para un paciente concreto en la actualidad, ni le proporcionarán ningún beneficio adicional; únicamente aumentará nuestro conocimiento sobre su enfermedad y los factores que determinan una mejor o peor respuesta a los diversos tratamientos, por lo

que quizás pueda ser de utilidad para otros pacientes con psoriasis en el futuro.

Si los resultados obtenidos tuviesen trascendencia para usted o sus familiares, le informaremos de los mismos, proporcionándole el consejo genético adecuado, según lo establecido en el artículo 47 de la Ley de Investigación Biomédica 15/2007. Sería conveniente que en este caso usted informe a sus familiares.

En todo momento se respetará su confidencialidad de acuerdo a la Ley Orgánica de Protección de Datos 15/1999. Aunque los resultados sean publicados, no se revelará su identidad. Debe usted saber que también se respetará su derecho a conocer los resultados o a decidir que no se le comuniquen los datos obtenidos. No obstante, cuando esta información, según criterio del médico responsable, sea necesaria para evitar un grave perjuicio para su salud o la de sus familiares biológicos, se informará a un familiar próximo o a un representante, previa consulta con el comité de ética. En todo caso, la comunicación se limitará exclusivamente a los datos necesarios para esta finalidad.

Finalmente, debe saber que usted es libre de decidir si quiere participar en este estudio, sin que se vea perjudicada su atención médica por ello. Además, podrá retirar su consentimiento en cualquier momento sin necesidad de tener que dar explicaciones y sin ningún perjuicio en su atención sanitaria. Si decide retirar su consentimiento después de habernos facilitado la muestra de sangre, tiene que avisarnos para que su muestra sea destruida. No obstante, no se destruirán los datos que hayan sido obtenidos hasta entonces.

Si tiene alguna duda sobre la información que acaba de leer, pregunte al médico que le ha facilitado esta hoja. Si en el futuro surge algún problema relacionado con el estudio, puede contactar con su médico o con los investigadores del estudio (Dr. Esteban Daudén, Dra. Mar Llamas y Dr. Chicharro del Servicio de Dermatología, teléfono 915202433).

Yo en calidad de
(paciente/otra relación con el paciente/testigo)

de (nombre y apellidos del paciente en caso de que no lo firme
él/ella)..... declaro
que he leído o le he leído al paciente la hoja de información del estudio.

1. Entiendo que la realización de la exploración clínica realizada, la toma de fotografías para la documentación cutánea, los estudios analíticos y la realización de biopsias cutáneas en los casos en que proceda, servirá al doble objetivo de valoración y tratamiento en práctica clínica habitual así como para el posterior estudio de los datos derivados de la mismas con la finalidad de conocer la implicación de los microARNs en los procesos de la patogénesis la psoriasis.

2. Entiendo que la aplicación de los datos que puedan encontrarse en la realización de este estudio pueden no ser directamente aplicables a mi caso particular.

3. Entiendo que mi participación es voluntaria y puedo revocar la autorización de participar en el estudio.

4. Respecto a la realización de la biopsia cutánea en los casos que proceda, me han sido explicados sus riesgos generales y personalizados y he firmado un consentimiento informado de la misma, que al igual que el presente puedo revocar sin necesidad de dar explicaciones acerca de mi actitud.

Nombre del participante: _____ Firma
y Fecha

Nombre del investigador: _____
Firma y Fecha

CONSENTIMIENTO DE PARTICIPACION 4 (Controles).

Nos dirigimos a usted para informarle sobre un estudio de investigación en el que se le invita a participar. El estudio ha sido aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica correspondiente y la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios, de acuerdo a la legislación vigente, el Real Decreto 223/2004, de 6 de febrero, por el que se regulan los ensayos clínicos con medicamentos.

Nuestra intención es tan solo que usted reciba la información correcta y suficiente para que pueda evaluar y juzgar si quiere o no participar en este estudio. Para ello lea esta hoja informativa con atención y nosotros le aclararemos las dudas que le puedan surgir después de la explicación. Además, puede consultar con las personas que considere oportuno.

PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA

Debe saber que su participación en este estudio es voluntaria y que puede decidir no participar o cambiar su decisión y retirar el consentimiento en cualquier momento, sin que por ello se altere la relación con su médico ni se produzca perjuicio alguno en su tratamiento.

OBJETIVOS DEL ESTUDIO.

Los microARNs son un tipo de RNA pequeños que regulan la expresión de genes, la disregulación de la expresión de este material genético se ha asociado a diferentes enfermedades incluidas las enfermedades autoinmunes. Nuestro objetivo es determinar si los microARNs pueden funcionar como un biomarcador que permita predecir la respuesta al tratamiento farmacológico en pacientes con psoriasis.

Procedimientos

Si acepto participar en este estudio, como resultado de mi participación:

-Se me requerirá que lea y firme este consentimiento tras responder a todas mis dudas.

-Se me realizará una extracción de 10 ml de sangre, coincidiendo el procedimiento con la realización de las analíticas necesarias en mi seguimiento habitual. La muestra será codificada (identificada con un número sin que figuren datos personales). Además, se van a recoger datos de su historia clínica como edad, sexo y fármacos que ha recibido y cómo ha respondido a ellos. Sus datos codificados serán incorporados a un archivo informático radicado en estos Hospitales y analizados posteriormente.

- Los datos y muestras biológicas obtenidos serán empleadas con doble finalidad; diagnóstica y de investigación, sin que esta segunda finalidad repercuta en el tipo o frecuencia de seguimiento del paciente.

DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO SOBRE LA PROTECCIÓN DE DATOS

Estoy conforme con la participación en el estudio mencionado anteriormente. Me han sido comunicados los objetivos de dicho estudio y estoy de acuerdo en que dentro del marco del estudio científico mis datos personales y médicos sean procesados, almacenados y valorados científicamente, de forma anónima, por el personal del Servicio de Dermatología del Hospital Universitario De La Princesa. El tratamiento, la comunicación y la cesión de los datos de carácter personal de todos los sujetos participantes se ajustará a lo dispuesto en la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre de protección de datos de carácter personal. De acuerdo a lo que establece la legislación mencionada, usted puede ejercer los derechos de acceso, modificación, oposición y cancelación de datos, para lo cual deberá dirigirse a su médico del estudio.

Los datos recogidos para el estudio estarán identificados mediante un código y solo su médico del estudio/colaboradores podrá relacionar dichos datos con usted y con su historia clínica. Por lo tanto, su identidad no será revelada a persona alguna.

Sólo se transmitirán a terceros y a otros países los datos recogidos para el estudio que en ningún caso contendrán información que le pueda identificar directamente, como nombre y apellidos, iniciales, dirección, nº

de la seguridad social, etc. En el caso de que se produzca esta cesión, será para los mismos fines del estudio descrito y garantizando la confidencialidad como mínimo con el nivel de protección de la legislación vigente en nuestro país.

El acceso a su información personal quedará restringido al médico del estudio/colaboradores, autoridades sanitarias (Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios), al Comité Ético de Investigación Clínica y personal autorizado por el promotor, cuando lo precisen para comprobar los datos y procedimientos del estudio, pero siempre manteniendo la confidencialidad de los mismos de acuerdo a la legislación vigente.

OTRA INFORMACIÓN RELEVANTE.

Este proyecto no está financiado y soy consciente de que no recibiré ninguna remuneración con mi participación.

Al firmar la hoja de consentimiento adjunta, usted se compromete a cumplir con los procedimientos del estudio que se le han expuesto.

Si usted decide retirar el consentimiento para participar en este estudio, ningún dato nuevo será añadido a la base de datos y, puede exigir la destrucción de todas las muestras identificables previamente retenidas para evitar la realización de nuevos análisis.

Lugar, fecha y firma del paciente

Firma del facultativo

Ante cualquier problema o efecto secundario podrán contactar en horario de mañana con la Dra. Llamas Velasco, el Dr. Chicharro o el Dr. Daudén Tello a través del 9152010330.

10.4. Publicaciones asociadas.

Chicharro P, Rodríguez-Jiménez P, Llamas-Velasco M, et al. Expression of miR-135b in psoriatic skin and its association with disease improvement. *Cells*. 2020;9:E1603 (Portada).



cells



Article

Expression of miR-135b in Psoriatic Skin and Its Association with Disease Improvement

Pablo Chicharro ^{1,†}, Pedro Rodríguez-Jiménez ^{1,†}, Mar Llamas-Velasco ¹, Nuria Montes ^{2,3}, Ancor Sanz-García ⁴, Danay Cibrian ^{5,6}, Alicia Vara ⁵, Manuel J Gómez ⁷, María Jiménez-Fernández ⁵, Pedro Martínez-Fleta ⁵, Inés Sánchez-García ⁵, Marta Lozano-Prieto ⁵, Juan C Triviño ⁸, Rebeca Miñambres ⁸, Francisco Sánchez-Madrid ^{5,6}, Hortensia de la Fuente ^{5,6,*} and Esteban Dauden ^{1,†}

¹ Dermatology Department, Instituto de Investigación Sanitaria Hospital Universitario de la Princesa (IISP), 28006 Madrid, Spain; somriem@gmail.com (P.C.); pedro.rodriguez.jimenez90@gmail.com (P.R.-J.); mar.llamasvelasco@gmail.com (M.L.-V.); estebandauden@gmail.com (E.D.)

² Rheumatology Department, Instituto de Investigación Sanitaria Hospital Universitario de la Princesa (IISP), 28006 Madrid, Spain; nuria.montes.casado@gmail.com

³ Fisiología Vegetal, Departamento Ciencias Farmacéuticas y de la Salud, Facultad de Farmacia, Universidad San Pablo-CEU, 28003 Madrid, Spain

⁴ Data Analysis Unit, Instituto de Investigación Sanitaria Hospital Universitario de la Princesa (IISP), 28006 Madrid, Spain; ancorsanz@gmail.com

⁵ Immunology Department, Instituto de Investigación Sanitaria Hospital Universitario de la Princesa (IISP), 28006 Madrid, Spain; danay.cibrian@gmail.com (D.C.); alicia.vara@salud.madrid.org (A.V.); jmfzdmaria@gmail.com (M.J.-F.); martinezq93@gmail.com (P.M.-F.); ines.sanchez-garcia9589@gmail.com (I.S.-G.); mlozanoprieto54@gmail.com (M.L.-P.); fsmadrid@salud.madrid.org (F.S.-M.)

⁶ CIBER de Enfermedades Cardiovasculares, Instituto de Salud Carlos III, 28009 Madrid, Spain

⁷ Bioinformatics Unit, Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC), 28029 Madrid, Spain; manueljose.gomez@cnic.es

⁸ Sistemas Genómicos, 46980 Valencia, Spain; jc.trivino@sistemasgenomicos.com (J.C.T.); rebeca.minambres@sistemasgenomicos.com (R.M.)

* Correspondence: hortensia.fuente@salud.madrid.org
† These authors contributed equally to this paper.

‡ These authors contributed equally to this paper.

Received: 25 May 2020; Accepted: 30 June 2020; Published: 2 July 2020



Abstract: miRNAs have been associated with psoriasis since just over a decade. However, we are far from a complete understanding of their role during the development of this disease. Our objective was to characterize the cutaneous expression of miRNAs not previously described in psoriasis, the changes induced following the treatment with biologicals and their association with disease improvement. Next generation sequencing was performed from five skin samples from psoriasis patients (lesional and non-lesional skin) and five controls, and from this cohort, 12 microRNAs were selected to be analyzed in skin samples from 44 patients with plaque psoriasis. In 15 patients, an additional sample was obtained after three months of biological treatment. MiR-9-5p, miR-133a-3p and miR-375 were downregulated in the lesional skin of psoriasis patients. After treatment, expression of miR-133a-3p, miR-375, miR-378a and miR-135b in residual lesions returned towards the levels observed in non-lesional skin. The decrease in miR-135b levels after treatment with biologics was associated with both the improvement of patients evaluated through Psoriasis Area and Severity Index score and the decrease in local inflammatory response. Moreover, basal expression of miR-135b along with age was associated with the improvement of psoriasis, suggesting its possible usefulness as a prognostic biomarker.

Chicharro P, Rodríguez-Jiménez P, De la Fuente H, et al. Mixed profile of cytokines in paradoxical eczematous eruptions associated with anti-IL-17 therapy. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2020;18:E30708 (Portada).

Clinical Communications

Mixed profile of cytokines in paradoxical eczematous eruptions associated with anti-IL-17 therapy

Pablo Chicharro, MD^a, Pedro Rodríguez-Jiménez, MD^a, Hortensia De la Fuente, MD, PhD^{a,c}, Javier Fraga-Fernández, MD, PhD^{a,c}, Danay Cibrián, MD, PhD^{a,c}, Francisco Sánchez-Madrid, PhD^{a,c}, and Esteban Daudén, MD, PhD^a

Clinical Implications

- Paradoxical eczema-like eruptions affecting psoriatic patients treated with different biological agents can result from the blockade of the Th1/Th17 axis. This would induce activation of the Th2 axis, causing a secondary eczema eruption in predisposed patients.

Paradoxical eczema-like eruptions have occasionally been described in patients with psoriasis treated with different biological agents. These therapies target different cytokines (Table 1). The blockade of the Th1/Th17 pathway may lead to activation of the opposing Th2 axis, favoring the appearance of atopic-like eczema.¹ We present the local cytokine profile evaluated by quantitative polymerase chain reaction of 2 patients with psoriasis with eczematous eruptions induced by anti-IL-17 drugs, trying to shed light into the pathogenesis of these reactions.

In case 1, a 63-year-old man with a 29-year lasting chronic plaque psoriasis and psoriatic arthritis attended our department with a severe flare of psoriasis and was initially treated with the anti-IL-17A monoclonal antibody secukinumab. One month later, although psoriasis had greatly improved, a disseminated highly pruritic eczematous eruption appeared involving the face, trunk, and extremities (Figure 1, A). Some eczematous lesions were observed on the border of the psoriatic plaques under remission (Figure 1, C), while most of them developed on apparently healthy skin. The patient had a childhood history of rhinoconjunctivitis and asthma. His daughter and granddaughter suffered from atopic dermatitis (AD). Total IgE was >5000 kU/L. A biopsy from an eczematous lesion showed hyperkeratosis with parakeratosis and spongiosis, without vesicles, changes consistent with chronic eczema (Figure 1, B). A second biopsy from a remaining psoriatic plaque showed psoriasiform dermatitis (Figure 1, D). The immunohistochemical study of both biopsies showed an inflammatory infiltrate mainly composed of CD3+ lymphocytes, with a predominance of CD4+ cells; staining with anti-CD117 (Figure E1, available in this article's Online Repository at www.jaci-inpractice.org) and tryptase was mildly positive in both samples, without significant differences between them. Cytokine gene expression assays showed predominance of Th2 cytokines in the eczematous lesion with high levels of IL-5, IL-13, and IL-4, whereas the psoriasis plaque showed higher expression of classical Th17 cytokines as

IL-17 and IL-22. Interestingly, IL-12b and IL-23 were more abundant in the eczematous lesion compared with the psoriasis plaque (Figure 1, E). Treatment was switched from secukinumab to the anti-IL-23 monoclonal antibody guselkumab, achieving complete clearance of all lesions for 1 year since then.

In case 2, a 58-year-old man with a 27-year history of severe plaque psoriasis presented with lesions on the sacral area, ears, hands, and sparsely on the trunk. During this time, he had been treated with cyclosporine, methotrexate, adalimumab, and ustekinumab. The patient was intolerant or only partially responsive to these treatments. He had 3 children with AD, but no personal history of allergy or atopic eczema. We treated him with secukinumab, and 6 months later, psoriasis had moderately improved, whereas pruritic eczematous lesions developed on his face, palms, and the antecubital fossae. A biopsy from one of the eczematous lesions showed hyperkeratosis with parakeratosis and epidermal spongiosis, without vesiculation, consistent with eczema. In this lesion, the presence of IL-12b and IL-22 was detected, whereas the rest of cytokines analyzed were undetectable (Figure 1, F). Two months later, secukinumab was withdrawn after the worsening of lesions. Then, eczematous lesions progressively improved and psoriasis was controlled with topical therapy. Treatment with the anti-IL-17A monoclonal antibody ixekizumab was started 1 year later after a further flare of psoriasis. After 2 months, the patient again presented new eczematous lesions (Figure 1, G). Total IgE was >5000 kU/L. A biopsy from a recent eczematous lesion showed epidermal spongiosis with vesicles, irregular acanthosis, and eosinophils, consistent with eczema (Figure 1, G). A second biopsy from a psoriatic plaque (Figure 1, H) showed a psoriasiform hyperplasia with parakeratosis, consistent with psoriasis (Figure 1, I). Messenger RNA (mRNA) expression studies showed a mixed pattern of cytokines in the psoriasis plaque, which expressed higher levels of IL-23, IL-17, and IL-22 but also IL-13 compared with the eczematous lesion (Figure 1, J). Similar to the first case, the eczematous lesion expressed higher levels of IL-12b compared with the psoriasis plaque (Figure 1, J). Immunohistochemical findings in the 3 biopsies were similar to those described in case 1. Ixekizumab was withdrawn and the eczematous lesions were cleared. Psoriasis is being partially controlled with topical therapy.

Psoriasis is mainly a Th1/Th17-mediated inflammatory disease. Activation of these cells leads to the production of several cytokines, including tumor necrosis factor (TNF), IL-17 (IL-17A/IL-17F), IL-26, and IL-29.² IL-23 is necessary for the activation and survival of type 17 T cells, whereas production of IL-22 by Th22 T cells contributes to epidermal hyperplasia.^{2,3} AD, on the other hand, is mainly a Th2-mediated disease, although increased expression of IL-17 and mainly IL-22 has been described.³ An epidermal barrier defect and the activation of Th2 cells, with the production of IL-4 and IL-13, lead to eczema lesions. Chronic AD also includes epidermal hyperplasia induced by IL-22 from activated Th22 cells, which is a shared pathway between psoriasis and AD.³ TNF-inhibitors can induce eczema in patients with psoriasis, and some case reports have also described the appearance of paradoxical eczematous eruptions associated with anti-IL-12/IL-23 (ustekinumab) and anti-IL-17 (secukinumab, ixekizumab) therapies.^{1,4,6} A history of atopy is the only known risk factor for these reactions.^{5,7} As all of these

Chicharro P, Sánchez-Moya A, Rodríguez-Jiménez P, et al. Tuberculosis re-screening in psoriatic patients under continuous biological therapy. Does the treatment modify the tuberculin skin test response? *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2019;33:e295-e296 (Portada).

Letters to the Editor

e295

- 6 Jockenhöfer F, Wollina U, Salva KA, Benson S, Disemond J. The PARACELUS score: a novel diagnostic tool for pyoderma gangrenosum. *Br J Dermatol* 2019; 180: 615-620.
- 7 McKenzie F, Cash D, Gupta A, Cummings LW, Ortega-Loayza AG. Biologic and small-molecule medications in the management of pyoderma gangrenosum. *J Dermatolog Treat* 2018; 1-13. <https://doi.org/10.1080/09546634.2018.1506083>. [Epub ahead of print]

DOI: 10.1111/jdv.15564

Tuberculosis re-screening in psoriatic patients under continuous biological therapy. Does the treatment modify the tuberculin skin test response?

Editor

Screening for latent tuberculosis infection (LTBI) before and during treatment with a tumour necrosis factor (TNF) α inhibitor is recommended, as there is an increased risk of tuberculosis reactivation.^{1,2} Regarding follow-up with tuberculin skin test (TST) of non-psoriatic patients under biological therapy, previous publications suggest that TST results are not modified.^{3,4} A possible influence of biological therapy on TST results in patients with psoriasis has not yet been studied.

We carried out a prospective, open-label, non-randomized study in consecutive patients with moderate-to-severe psoriasis, who required initiating biological treatment for the first time. Tuberculosis screening at baseline included TST and booster, chest X-ray, previous close contact with tuberculosis patients, previous LTBI diagnosis and history of chemoprophylaxis. LTBI was defined as: an initial TST or booster with a local induration ≥ 5 mm, and/or chest X-ray suggestive of tuberculosis infection, in the absence of active disease symptoms. TST was repeated within a period between 12 weeks and 12 months after the start of biological therapy.

Chi-squared test was used for the comparison of qualitative variables, Student *t*-test for quantitative variables with a normal distribution and Mann-Whitney *U*-test for variables with a non-normal distribution.

The study population included 172 patients (Table 1). Mean duration of exposure to biological treatment was 27 months (range: 1-96). At baseline, LTBI was diagnosed in 48 (27.9%) patients. No cases of active tuberculosis were found. A significant relationship was observed between TST positivity and male gender ($P = 0.03$). The risk of presenting a positive TST reaction was 2.6-fold higher (CI: 1.6-4.2) in the presence of a known past contact with tuberculosis. Positive TST patients were older than negative TST patients ($P = 0.051$). There were no statistically

Table 1 Baseline data

Baseline data	Patients (n = 172)
Sex (male/female)	105/67
Age (median \pm SD, years)	44.6 \pm 15.1
Weight (median \pm SD, Kg)	76.2 \pm 14.6
Country of birth, n(%)	
Spain	157 (91.2)
Others	15 (8.8)
Immunosuppressive diseases \dagger , n(%)	30 (17.4)
Diagnosis, n(%)	
Plaque psoriasis	166 (96.5)
Erythrodermic psoriasis	3 (1.73)
Pustular psoriasis	3 (1.73)
Disease duration (median \pm SD, years)	17.8 \pm 11
PASI (median \pm SD)	23.4 \pm 12
BSA (median \pm SD)	33.2 \pm 22
Psoriatic arthritis, n(%)	39 (22.7)
Previous immunosuppressant treatments, n(%)	
Cyclosporine	97 (56.7)
Methotrexate	79 (46.2)
Prednisone	14 (8.2)
Azathioprine	14 (8.2)
Biological therapy, n(%)	
Etanercept	73 (42.4)
Adalimumab	45 (26.2)
Infliximab	33 (19.2)
Ustekinumab	21 (12.2)
Tuberculosis data, n(%)	
Positive TST and/or booster	44 (25.6)
Abnormal chest X-ray	10 (5.8)
Recent tuberculosis contact history	8 (4.7)

\dagger Immunosuppression: history of HIV, diabetes, renal failure, lymphoproliferative processes and/or cancer in the last 5 years, excluding non-melanoma skin cancer.

BSA: Body Surface Area; PASI: Psoriasis Area and Severity Index; SD: standard deviation; TST: tuberculin skin test.

significant differences in the rest of different variables at baseline between TST positive and TST negative patients result.

A second TST was performed within a period between 12 weeks and 12 months after the start of continuous biological therapy in 84 consecutive patients, with no changes in the result in 70 (83%). Of the 44 patients with a positive baseline TST, only 7 (15.9%) had a negative second TST. No patient with TST reaching 15 mm at baseline experienced a negative conversion. From 40 patients with a negative baseline TST, only seven conversions to positive TST were observed (Fig 1). Of these subjects, five were classified as presenting recent LTBI after discarding active disease. Another positive conversion corresponded to a patient with a negative baseline TST result initially diagnosed as presenting LTBI on the basis of chest X-ray abnormalities. The last case was a patient with primary tuberculous lymphadenitis during treatment with infliximab (all baseline tests TST were normal or negative) who reported a recent

Chicharro P, García-Río I, Rodríguez-Jiménez P, et al. Prevalence of amyloid deposits determined by fine-needle aspiration of abdominal fat in patients with psoriasis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2017;31:e280-e281 (Portada).

e280

Letters to the Editor

6. Piscioli F, Fusio T, Roncati L. Diagnostic approach to melanocytic lesion of unknown malignant potential. *Melanoma Res* 2016; 26: 91–92.
7. Piscioli F, Fusio T, Roncati L. Diagnostic disputes regarding atypical melanocytic lesions can be solved by using the term MELTUMP. *Turk Patoloji Derg* 2016; 32: 63–64.
8. Piscioli F, Fusio T, Roncati L. Thin melanoma subtyping fits well with the American Joint Committee on Cancer staging system. *Melanoma Res* 2016; 26: 636.

DOI: 10.1111/jdv.14023

Response to 'Surgical outcomes reflect the histological types of cutaneous malignant melanoma'

Editor

On behalf of my co-authors, we have read the letter by Dr. Roncati and collaborators 'Surgical outcomes reflect the histological types of cutaneous malignant melanoma', as well as the publications cited herein, with great interest. We would like to clarify that, in our systematic review 'Surgical outcomes in patients with cutaneous malignant melanoma in Europe – a systematic literature review',¹ we have not made our own recommendations regarding the use of sentinel node biopsy to assess staging of cutaneous malignant melanoma of >1 mm thickness, rather we have quoted the current ESMO guidelines on this point.² We welcome further investigation into improved prognostic markers in thin melanomas – with the aim of identifying subgroups with adverse prognoses that could better benefit from sentinel node biopsy. We also believe that this topic may be further addressed in the next version of the AJCC staging system for melanoma. Publication of these new guidelines is awaited with interest.

F.C. Svedman*

Department of Oncology and Pathology, Karolinska Institutet, Karolinska University Hospital, Solna, 171 76, Stockholm, Sweden

*Correspondence: F.C. Svedman. E-mail: fernanda.costa-svedman@karolinska.se

References

1. Svedman FC, Spanopoulos D, Taylor A, Amelio J, Hansson J. Surgical outcomes in patients with cutaneous malignant melanoma in Europe – a systematic literature review. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2016. doi: 10.1111/jdv.13950.
2. Dummer R, Hauschild A, Lindtner N et al. Cutaneous melanoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2015; 26 (Suppl 5): v126–v132.

DOI: 10.1111/jdv.14024

Prevalence of amyloid deposits determined by fine-needle aspiration of abdominal fat in patients with psoriasis

Editor

Amyloidosis is characterized by the extracellular deposition of amyloid in tissues. Systemic AA amyloidosis (also known as secondary amyloidosis) is associated with long-standing inflammatory disorders, including psoriasis. Fine-needle aspiration of abdominal fat (FNAAF) is a simple and reliable method for screening of amyloid deposition. It has a sensitivity of 80% in patients with established systemic amyloidosis when studied by an experienced observer.¹

We performed a prospective study of patients with a ≥10-year history of moderate-to-severe psoriasis attended in our department. Amyloidosis screening was performed using FNAAF. Fat samples were stained with Congo red and examined under polarized light to search for apple-green birefringence by the same pathologist (CM, Coordinator of the Cytology Unit, with more than 40 years of experience). The presence of a clear amyloid deposit or two consecutive unclear but probable deposits was considered a positive result. To rule out systemic involvement in patients with positive test results, we performed a complete physical examination, general blood and 24-h urine protein excretion tests, serum and urine protein electrophoresis, electrocardiogram and imaging studies. During a 10-year follow-up, patients with positive test results for amyloid underwent regular physical examinations and laboratory tests to look for evidence of systemic involvement or clinical amyloidosis. Chi-square test was used to assess associations between variables, and Fisher's exact test was applied for dichotomous variables.

The study population included 76 patients (Table 1). The vast majority of patients were receiving or had received systemic treatment for psoriasis. At baseline, FNAAF revealed amyloid deposition in two patients. The results were unclear in a further 13 patients, four of whom had probable deposits in a second FNAAF procedure. These results were therefore considered positive. The remaining patients were amyloid negative in the second procedure. In summary, six of 76 patients (7.9%) showed amyloid deposits in subcutaneous abdominal fat (Fig. 1). Comparison between amyloid-positive and amyloid-negative patients is shown in Table 1. Those with positive test results showed an increased prevalence of psoriatic arthritis (50% vs. 34.3%). Nevertheless, no statistically significant differences were found. All patients with positive test results had plaque psoriasis. At screening, none of them had clinical manifestations of amyloidosis or relevant findings in the additional tests performed. Other causes of AA amyloidosis were excluded. During the 10-year follow-up

Rodríguez-Jiménez P, Chicharro P, Llamas-Velasco M, et al.
Thrombospondin-1/CD47 Interaction Regulates Th17 and Treg
Differentiation in Psoriasis. *Front Immunol.* 2019;10:1268 (Portada).



ORIGINAL RESEARCH
published: 04 June 2019
doi: 10.3389/fimmu.2019.01268



Thrombospondin-1/CD47 Interaction Regulates Th17 and Treg Differentiation in Psoriasis

Pedro Rodríguez-Jiménez¹, Pablo Chicharro¹, Mar Llamas-Velasco¹, Danay Cibrian², Laura Trigo-Torres², Alicia Vara², María Jiménez-Fernández², Javier Sevilla-Montero², María J. Calzada², Francisco Sánchez-Madrid^{2,3}, Hortensia de la Fuente^{2,3*} and Esteban Daudén^{1*}

OPEN ACCESS

Edited by:

J. Michelle Kahlenberg,
University of Michigan, United States

Reviewed by:

Thomas S. McCormick,
Case Western Reserve University,
United States
David D. Roberts,
National Institutes of Health (NIH),
United States

*Correspondence:

Hortensia de la Fuente
hortensia.fuente@salud.madrid.org

[†]These authors have contributed
equally to this work

Specialty section:

This article was submitted to
Autoimmune and Autoinflammatory
Disorders,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 25 January 2019

Accepted: 17 May 2019

Published: 04 June 2019

Citation:

Rodríguez-Jiménez P, Chicharro P,
Llamas-Velasco M, Cibrian D,
Trigo-Torres L, Vara A,
Jiménez-Fernández M,
Sevilla-Montero J, Calzada MJ,
Sánchez-Madrid F, de la Fuente H and
Daudén E (2019)
Thrombospondin-1/CD47 Interaction
Regulates Th17 and Treg
Differentiation in Psoriasis.
Front. Immunol. 10:1268.
doi: 10.3389/fimmu.2019.01268

Accumulating evidence on the role of Thrombospondin-1 (TSP-1) in the immune response has emerged during the last years. In spite of the importance of TSP-1 not only as anti-angiogenic factor but also as an immunomodulatory molecule, studies on the role of TSP-1 in psoriasis have been neglected. TSP-1 and CD47 expression were analyzed in skin samples from psoriasis patients and control subjects using RT-PCR and immunofluorescence. Expression of these molecules was also evaluated in peripheral blood CD4+ T cells, moDCs, and circulating primary DCs. The functional role of TSP-1/CD47 signaling axis in psoriasis was assessed in Th17 and Treg differentiation assays. Additionally, small interfering RNA assays specific to TSP-1 were performed in CD4+ T cells and monocyte derived DC to specifically evaluate the function of this protein. Lesional skin of psoriasis patients expressed lower TSP-1 and CD47 mRNA levels compared to non-lesional skin or skin from controls. Immunofluorescence staining revealed decreased expression of CD47 in CD45+ dermal cells from psoriasis samples compared to control subjects. Peripheral CD4+ T cells and circulating primary DCs from psoriasis also expressed lower levels of CD47 compared to controls. Although no significant differences were detected in TSP-1 expression in CD4+ T cells and moDCs between patients and controls, TSP-1 expression in psoriasis patients inversely correlated with disease activity evaluated by the Psoriasis Area and Index Activity. Furthermore, exogenous TSP-1 inhibited Th17 differentiation and stimulated the differentiation of CD4+ T cells toward Treg cells. Furthermore, RNA interference specific for TSP-1 confirmed the role of this molecule as a negative regulator of T cell activation. Because of the impact of TSP-1/CD47 signaling axis in Th17 and Treg differentiation, a dysregulated expression of these molecules in the immune cells from psoriasis patients may favor the exacerbated inflammatory response in this disease.

Keywords: psoriasis, CD47, TSP-1, Th17, Treg cells

Rodríguez-Jiménez P, Chicharro P, Godoy A, Llamas-Velasco M, García M, Daudén E. No evidence for induction of autoantibodies or autoimmunity during treatment of psoriasis with ustekinumab. *Br J Dermatol.* 2017;177:862-863 (Portada).

Research letter

No evidence for induction of autoantibodies or autoimmunity during treatment of psoriasis with ustekinumab

DOI: 10.1111/bjd.15654

DEAR EDITOR, Ustekinumab is a human monoclonal antibody directed against the p40 subunit of both interleukin (IL)-12 and IL-23.¹ It has been shown to be very effective in treating moderate-to-severe plaque psoriasis and psoriatic arthritis with a good safety profile.² In the last decade, the appearance of antinuclear antibodies (ANA) and induction of autoimmune diseases during treatment with tumour necrosis factor (TNF)- α inhibitors have been described.^{3,4}

The primary objective of our study was to evaluate the occurrence of autoimmune diseases and development of ANA, anti-extractable nuclear antigen (ENA) and antidouble-stranded DNA (dsDNA) antibodies in patients with psoriasis treated with ustekinumab.

A prospective, single-centre, longitudinal, observational cohort study was performed. Inclusion criteria were: (i) adult

patients with moderate-to-severe psoriasis under treatment with ustekinumab for at least 16 weeks; and (ii) patients with no known previous connective tissue disease. The therapeutic regimen included subcutaneous ustekinumab, 45 mg at 0, 4 and then every 12 weeks. Psoriasis Area and Severity Index (PASI) and Body Surface Area (BSA) were registered at baseline and 4, 12 and 24 months after starting treatment with ustekinumab.

Methodology of laboratory tests performed to evaluate ANA, anti-dsDNA and anti-ENA antibodies is summarized in Figure 1a. All were carried out at baseline ($n = 76$) and the fourth month of treatment ($n = 76$). In patients who were monitored until 12 ($n = 34$) and 24 ($n = 24$) months of continuous therapy, an extra determination was performed. Additionally, the first 23 consecutive patients underwent an extended autoantibody (AAb) study at baseline and after 4 months of therapy (Fig. 1a).

Seventy-six patients (46 men, 30 women) met the inclusion criteria. The majority of patients (95%) had plaque-type psoriasis. At baseline, 15 patients (19%) were ANA positive. Mean age of ANA-positive patients was 56 years, all men, none with

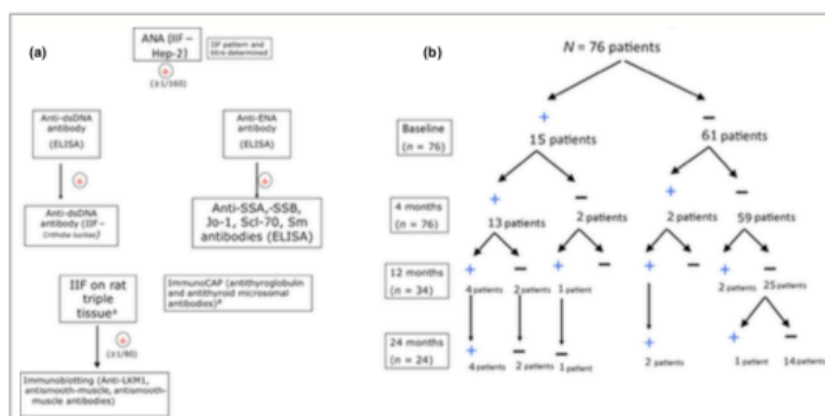


Fig 1. (a) Methodology of the laboratory tests performed. ANA, antinuclear antibodies; dsDNA, double-stranded DNA; IIF, indirect immunofluorescence; ENA, extractable nuclear antigen; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay. ImmunocAP[®], Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, U.S.A. ^aPatients who underwent extended study ($n = 23$). (b) Evolution and outcomes of ANA determination in patients.

Martínez-Hernández R, de la Fuente H, Lamana A, et al. Utility of Circulating Serum miRNA Profiles to Evaluate the Potential Risk and Severity of Immune-Mediated Inflammatory Disorders. *J Autoimmun.* 2020;111:E102472. (Portada).



Utility of circulating serum miRNA profiles to evaluate the potential risk and severity of immune-mediated inflammatory disorders

Rebeca Martínez-Hernández^{a,g,1}, Hortensia de la Fuente^{b,c,1}, Amalia Lamana^{c,1}, Miguel Sampedro-Núñez^{a,g}, Ana Ramos-Leví^{a,g}, Ana Serrano-Somavilla^{a,g}, Rosario García-Vicuña^c, Ana M. Ortiz^c, Esteban Daudén^d, Mar Llamas-Velasco^d, Pablo Chicharro^d, Pedro Rodríguez-Jiménez^d, Ancor Sanz-García^e, Francisco Sánchez-Madrid^{b,1}, Isidoro González-Álvarez^{c,*,**}, Mónica Marazuela^{a,g,*}

^a Department of Endocrinology, Hospital Universitario de La Princesa, Instituto de Investigación Princesa, Universidad Autónoma de Madrid, C/ Diego de León 62, 28006, Madrid, Spain

^b Department of Immunology, Hospital Universitario de La Princesa, Instituto de Investigación Princesa, Universidad Autónoma de Madrid, C/ Diego de León 62, 28006, Madrid, Spain

^c Department of Rheumatology, Hospital Universitario de La Princesa, Instituto de Investigación Princesa, Universidad Autónoma de Madrid, C/ Diego de León 62, 28006, Madrid, Spain

^d Department of Dermatology, Hospital Universitario de La Princesa, Instituto de Investigación Princesa, Universidad Autónoma de Madrid, C/ Diego de León 62, 28006, Madrid, Spain

^e Data Analysis Unit, Hospital Universitario de La Princesa, Instituto de Investigación Princesa, Universidad Autónoma de Madrid, C/ Diego de León 62, 28006, Madrid, Spain

^f Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Cardiovasculares (CIBERCV), Spain

^g Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER GCV14/ER/12), Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

microRNAs
Serum
Immune-mediated inflammatory disorders
Graves' disease
Psoriasis
Rheumatoid arthritis

ABSTRACT

Immune-mediated inflammatory disorders (IMID) are a group of diseases that present inflammation as a major pathogenic mechanism. They affect 15% of the population and pose a heavy socio-economic burden. Despite the growing knowledge on the etiopathogenesis of these diseases and the marked improvement in their management, there is a lack of predictive markers of IMID development or severity suitable for early diagnosis and adjustment of treatment intensity. The possibility that certain circulating miRNA profiles could be used as biomarkers of risk of development and/or severity of several autoimmune diseases has fuelled the interest in using them to improve the selection of successful treatments. The multi-pronged approach proposed here sought to reveal circulating miRNAs and miRNA signatures that could act as new predictive biomarkers of IMID development and severity. Our results showed that the circulating levels of miR-19b and miR-26b were significantly decreased ($p < 0.001$) in IMID patients compared to controls. Furthermore, receiver operating characteristic (ROC) curve analysis showed that these miRNAs were suitable discriminators capable to identify an IMID, with areas under the curve (AUC) of 0.85 and 0.83, respectively. In addition, we established that miR-19a and miR-143 were significantly increased in IMID patients with severe disease ($p < 0.05$). In summary, our findings identify two different miRNA signatures. One of them is associated with the presence of IMIDs and could lead to the development of tools for their early detection. The second signature is able to discriminate between mild and severe forms of these disorders and could be a putative tool to select patient candidates for a more intense treatment.

* Corresponding author. Hospital Universitario de La Princesa, Instituto de Investigación Princesa, Universidad Autónoma de Madrid, C/ Diego de León 62, 28006, Madrid, Spain

** Corresponding author.

E-mail addresses: isidoro.ga@ur.es (I. González-Álvarez), monica.marazuela@salud.madrid.org (M. Marazuela).

¹ R.M.H, H.d.l.F and A.L. contributed equally to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.jaut.2020.102472>

Received 6 March 2020; Received in revised form 18 April 2020; Accepted 19 April 2020

Available online 05 May 2020

0896-8411/ © 2020 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Herrero-Moyano M, Pedraz J, Muñoz-Aceituno E, et al Chicharro P, Reolid A, Lara S, Daudén E. Trough (C0) and 2-hour post-dose (C2) cyclosporine monitoring in patients with moderate-to-severe psoriasis". *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2019;33:e215-e217 (Portada).

Letters to the Editor

e215

No statistical differences were found in the expression of *PTGDR2* in men or women comparing affected and unaffected areas (Fig. 1b3,c3).

Garza *et al.*¹ described overexpression of prostaglandin synthase (*PTGDS*) on baldness areas and its product, the prostaglandin D2 (*PGD2*), as an inducer of the premature catagen phase. *PGD2* activity is mediated by the *PGD2* receptor *PTGDR2* (*GPR44*).^{1,2} A Mantel *et al.*³ suggested that reactive oxygen species (*ROS*)-driven function in hair follicles keratinocytes is the molecular mechanism by which *PGD2* induced testosterone synthesis. Induction of *ROS* by *PGD2* is attributed to 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J2 (15d-PGJ2), a spontaneous electrophilic metabolite of *PGD2*.^{4,5} Therefore, high *PGD2* levels found in the bald scalp of AGA may lead to increased testosterone, which can be converted locally to dihydrotestosterone by 5 α -reductases to induce AGA.

It has been suggested that the inhibitors of *PTGDR2* may reverse hair growth through inhibition by *PGD2* activity.⁶ A multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, Phase 2A study of setipitant (oral *PTGDR2* receptor antagonist) 500 mg tablets BID in AGA is being performed (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02781311). It is interesting that this receptor is not overexpressed in our patients. Perhaps research on treatment should focus on drugs that target *PTGDS* activity and not *PTGDR2*.

Prostaglandin F2 (*PTGF2*) and prostaglandin E2 (*PTGE2*) act synergistically in hair follicles, resulting in hair growth and elongation of the anagen phase,^{7,8} antagonizing *PTGDR2*. We found that men patients with early stages of AGA overexpress *PTGES*, the enzyme that synthesizes *PTGE2*. These results are contrary to those reported in the literature, which reports that *PTGES* is less expressed in patients with AGA. Similar results with other genes involved in AGA, such as *WNT7A*, *CASP7*, *TNF* and *DKK1* were overexpressed in areas of alopecia in patients with AGA in early stages of the disease.^{9,10} We hypothesized that this could be due to a negative feedback mechanism at the early stages of AGA, where *PTGES* is stimulated in an attempt to compensate hair loss.

Herein, we found that *PTGDS* is overexpressed in AGA and *PTGES* is overexpressed in the first stages of AGA. We did not find differences in *PTGDR2* in affected and unaffected individuals. Perhaps, the role of prostaglandins differs from first to late stages, resulting in different clinical response to therapy with drugs that target *PTGDR2*, *PTGDS* and *PTGES* depending on the stage of AGA.

C.D. Villarreal-Villarreal,^{1,2} R.D. Sinclair,^{3,4} L. Martínez-Jacobo,^{2,5,6} V. Garza-Rodríguez,¹ S.A. Rodríguez-León,¹ A.C. Lamadrid-Zertuche,² R. Rodríguez-Gutiérrez,⁷ R. Ortiz-López,^{2,8} A. Rojas-Martínez,^{7,8} J. Ocampo-Candiani^{1,*}

¹Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina y Hospital Universitario, Departamento de Dermatología, Monterrey, Mexico,

²Universidad Autónoma de Nuevo León, Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud, Monterrey, Mexico, ³Epworth Hospital, East Melbourne, Vic., Australia, ⁴Sinclair Dermatology Clinical Trial Centre, East Melbourne, Vic., Australia, ⁵Vicerrectoría de Ciencias de la Salud, Departamento de Ciencias Básicas, Universidad de Monterrey, San Pedro Garza García, Mexico, ⁶Facultad de Medicina, Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Mexico, ⁷Facultad de Medicina, Departamento de Medicina Interna, Servicio de Endocrinología, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Mexico, ⁸Teconológico de Monterrey, Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Monterrey, Mexico

*Correspondence: J. Ocampo-Candiani. E-mail: jocampo2000@yahoo.com.mx

References

- Garza LA, Liu Y, Yang Z *et al.* Prostaglandin D2 inhibits hair growth and is elevated in bald scalp of men with androgenetic alopecia. *Sci Transl Med* 2012; **4**: 126-134.
- Riccioni E, FitzGerald GA. Prostaglandins and inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011; **31**: 986-1000.
- Mantel A, McDonald JT, Goldborough K, Harvey VM, Chan J. Prostaglandin D2 uses components of ROS signaling to enhance testosterone production in keratinocytes. *J Invest Dermatol Symp Proc* 2017; **18**: S81-S84.
- Shibata T, Kondo M, Otsuka T, Shibata N, Kobayashi M, Uchida K. 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J2: A prostaglandin D2 metabolite generated during inflammatory processes. *J Biol Chem* 2002; **277**: 10459-10466.
- Wang JJ, Mak OT. Induction of apoptosis by 15d-PGJ2 via ROS formation: an alternative pathway without PPARgamma activation in non-small cell lung carcinoma A549 cells. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2011; **94**: 104-111.
- Nieves A, Garza LA. Does prostaglandin D2 hold the cure to male pattern baldness? *Exp Dermatol* 2014; **23**: 224-227.
- Geng L, Hanson WR, Malkinson FD. Topical or systemic 16, 16 dm prostaglandin E2 or WR-2721 (WR-1065) protects mice from alopecia after fractionated irradiation. *Int J Radiat Biol* 1992; **61**: 533-537.
- Sasaki S, Hozumi Y, Kondo S. Influence of prostaglandin F2 α and its analogues on hair regrowth and follicular melanogenesis in a murine model. *Exp Dermatol* 2005; **14**: 323-328.
- Martínez-Jacobo L, Ortiz-López R, Salinas-Santander M *et al.* Evaluation of the expression of genes associated with inflammation and apoptosis in androgenetic alopecia by targeted RNA Seq. *Skin Appendage Disord* 2017; **4**: 268-273.
- Fancz MM, Mahmoud SB, Shaker OG, Saleh MA. Assessment of tissue levels of dickkopf-1 in androgenetic alopecia and alopecia areata. *J Cosmet Dermatol* 2016; **15**: 10-15.

DOI: 10.1111/jdv.15479

Trough (C0) and 2-hour postdose (C2) cyclosporine monitoring in patients with moderate-to-severe psoriasis

Editor

Cyclosporine (CyA) has successfully been used to treat moderate-to-severe psoriasis. Therapeutic drug monitoring is an

10.5. Material suplementario.

deepBase	Provides a database for annotations and discovery of the non-coding RNAs including microRNAs, siRNAs, piRNAs from sequencing data.
miRBase	Provides the database which can be used to search annotations and sequences of miRNAs.
microRNA.org	Gives the information relating the microRNA expression patterns observed experimentally and also predicts the targets of microRNA & target downregulation scores.
miRGen 2.0	A database providing genomic information and regulation of miRNA.
miRNAMap	Provides genomic maps of genes in mammalian genomes
PMRD	Provides database for Plant microRNA sequences
TargetScan	It classifies miRNAs by their conservation level (species-specific, amongst mammals and broadly conserved amongst vertebrates) and adds up them in families according to their seed sequence.
VIRmiRNA	Focuses on the experimental viral miRNA, its targets and anti-viral miRNAs.
StarScan	Allows scanning of small RNAs mediated RNA cleavage mechanism.
miRwalk	Collects and compares the outcomes from available miRNA-to-mRNA databases
MBSTAR	Helps in finding true or functional binding sites of miRNA.
RepTar	Predicts inverse miRNA target by using RepTar algorithm.
miRTarBase	Provides microRNA-target interactions.
miRecords	Source for miRNA target interactions of animals.
Diana-microT	Provides an algorithm on the basis of several parameters for each and every miRNA. It also combines the conserved and non-conserved recognition elements of miRNA and gives a final prediction score.
StarBase	Decodes various miRNA.
TarBase	Provides database for experimentally supported animal microRNA targets
Firefly Discovery Engine	It is a database of miRNA which is published in various research papers. This will provide the detailed information of required miRNA through user's keywords
miRGator	This provides miRNA information related to diversity, target relationships and expression profiles.

Tabla Suplementaria 1: Principales bases de datos y portales en red disponibles para la búsqueda de microARNs. [Singhvi et al., 2018].

miRNA	Tissue/cell type	Expression	Target genes	Biological function	References
miR-21	Human skin, human PBMCs	Increased	<i>TIMP3, TPM1, PDCD4, PTEN, IL12A, RECK, RTN4, NFIB</i>	Regulation of keratinocyte proliferation, inflammation, T-cell apoptosis, and angiogenesis	(Ichihara et al., 2011; Joyce et al., 2011; Liu et al., 2011; Lovendorf et al., 2014, 2015; Meisgen et al., 2012; Sonkoly et al., 2007; Zibert et al., 2010)
miR-31	Human skin	Increased	<i>FIH-1, STK40</i>	Regulation of keratinocyte differentiation, NF- κ B activity, angiogenesis, and leukocyte migration to the skin	(Joyce et al., 2011; Peng et al., 2012; Sonkoly et al., 2007; Xu et al., 2013; Zibert et al., 2010)
miR-135b	Human skin, primary human keratinocytes	Increased	<i>COL4A3</i>	Regulation of keratinocyte differentiation and proliferation	(Choi et al., 2013; Joyce et al., 2011)
miR-136	Human skin, primary human keratinocytes	Increased	<i>PPP2R2A</i>	Regulation of TGF- β 1-induced keratinocyte proliferation arrest	(Zhang et al., 2015; Zibert et al., 2010)
miR-138	Human PBMCs	Increased	<i>RUNX3</i>	Regulation of the Th-1/Th-2 balance in CD4 ⁺ T cells	(Fu et al., 2015)
miR-146a	Human skin, human PBMCs, primary human keratinocytes	Increased	<i>IRAK1, TRAF6, EGFR</i>	Regulation of hematopoietic development, inflammation, immune cell mediators, and keratinocyte proliferation	(Lovendorf et al., 2015; Meisgen et al., 2014; Sonkoly et al., 2007; Xia et al., 2012; Zhang et al., 2014; Zibert et al., 2010)
miR-155	Human skin	Increased	<i>CTLA-4</i>	Regulation of hematopoietic development and inflammation	(Ichihara et al., 2011; Lovendorf et al., 2015)
miR-184	Human skin	Increased	<i>AGO2</i>	Regulation of posttranscriptional modification of mRNA and miRNA biogenesis via the miRISC complex	(Roberts et al., 2013)
miR-203	Human skin, primary human keratinocytes	Increased	<i>SOCS-3, SOCS-6, p63, TNFα, IL8, IL24</i>	Regulation of inflammation, STAT3 signaling, and keratinocyte proliferation/differentiation	(Lerman et al., 2011; Primo et al., 2012; Raaby et al., 2015; Sonkoly et al., 2007; Wei et al., 2013; Yi et al., 2008; Zibert et al., 2010)
miR-210	Human PBMCs	Increased	<i>FOXP3</i>	Regulation of regulatory T cells and their cytokine production	(Zhao et al., 2014)
miR-221/222	Human skin	Increased	<i>TIMP3, c-KIT, p57</i>	Regulation of keratinocyte and immune cell proliferation	(Joyce et al., 2011; Zibert et al., 2010)
miR-424	Human skin	Increased	<i>MEK1, Cyclin E1</i>	Regulation of keratinocyte proliferation	(Ichihara et al., 2011; Lerman et al., 2011)
miR-99a	Human skin	Decreased	<i>IGF-1R</i>	Regulation of keratinocyte proliferation and differentiation	(Ichihara et al., 2011; Lerman et al., 2011; Lovendorf et al., 2015)
miR-125b	Human skin, human serum	Decreased	<i>FGFR2, TNF-α</i>	Regulation of keratinocyte proliferation/differentiation and inflammation	(Koga et al., 2014; Lovendorf et al., 2015; Sonkoly et al., 2007; Xu et al., 2011)

Tabla Suplementaria 2: MicroARNs más relevantes alterados en la psoriasis, sus dianas y funciones biológicas. NF- κ B: factor nuclear kappa-potenciador de cadena ligera de células B activadas; PBMC: monocitos de sangre periférica; STAT3: transductor de señal y activador de la transcripción 3; TGF- β 1: factor de crecimiento transformante β 1 [Hawkes et al., 2016].

miRNA	Numbers of clinical samples	Source	Targets/Regulators	Signaling Pathways	Function and comments
miR-125b	25 psoriasis patients and 27 normal individuals were recruited.	Keratinocytes	FGFR2	Cell proliferation and differentiation	Overexpression of miR-125b in primary human keratinocytes repressed proliferation and induced the expression of several known differentiation markers.
let-7b	A total of 32 psoriasis subjects and 10 healthy volunteers were enrolled in the present study.	Serum, HaCaT and 293T cells	BRD4	Jagged-1/Notch signaling pathway	miR-125b tightly binds to BRD4 and confines the translation process of the Jagged-1 ligand. By suppressing the activation of the Notch signaling pathway, miR-125b inhibits the proliferation of psoriasis cells.
miR-145-5p	4 patients with psoriasis and 4 healthy subjects were enrolled.	Keratinocytes	IL-6	ERK1/2 signaling pathway	Let-7b directly targets IL-6, an indispensable cytokine regulating cell differentiation, which is induced in the affected epidermis of psoriasis patients.
miR-187	10 patients with psoriasis and 10 healthy subjects were recruited in this study.	Keratinocytes	MLK3, STAT3 and NF- κ B	AKT/GSK, MAPK, mTOR and NF- κ B signaling pathways	Overexpression of miR-145-5p in normal human epidermal keratinocytes inhibited cell proliferation and production of chemokines. Silencing miR-145-5p enhanced NHEK proliferation and augmented chemokine secretion.
miR-194	Psoriatic skin samples and adjacent uninvolved psoriatic skin samples were obtained.	Keratinocytes	CD276	CD276/STAT3 signaling pathways	Overexpression of miR-187 reduced keratinocytes hyperproliferation.
miR-4516	15 patients with psoriasis and 10 healthy subjects were enrolled in the present study.	Keratinocytes	GRHL2		Overexpression of miR-194 repressed the proliferation and stimulated the differentiation of primary human keratinocytes, whereas miR-194 suppression stimulated the proliferation and repressed their differentiation.
miR-876-5p	Biopsies from lesional (n = 15) and non-lesional (n = 3) area were obtained from psoriasis patients. Foreskin samples served as healthy controls.	Keratinocytes	FN1, ITGA9, STAT3, Bcl-2 and Cyclin D1		miR-4516 silencing in psoriatic skin might contribute to enhanced migration, resistance to apoptosis and differentiation as seen in psoriasis lesional keratinocytes.
miR-181b-5p	Psoriasis and normal skin tissues were collected from 10 psoriasis patients.	Keratinocytes/plasma	Ang-1	PI3K/AKT and ERK signaling pathway	Invasion and adhesion, serving as important behavioral traits of epidermal keratinocytes cells, were suppressed by excessive miR-876-5p in psoriasis cells
miR-181b	35 cases of psoriatic lesional skin tissues and 25 cases of healthy skin tissues were collected.	Human epidermal keratinocytes (HEKs)	Akt3	Akt/mTOR Signaling	Upregulation of miR-181b-5p inhibited HEKs proliferation at least partly by targeting Akt3.
miR-486-3p	28 patients diagnosed with psoriasis and 20 healthy controls who underwent plastic surgery were recruited.	Human epidermal keratinocytes (HEKs)	TLR4	TLR4 pathway	miR-181b negatively regulates the proliferation of HEKs in psoriasis and might provide new insights for seeking novel targets of treatment and prognosis of psoriasis.
miR-126	Psoriatic lesions and the adjacent non-lesional skin were collected from 25 patients. Normal skin harvested from 25 healthy Participants.	Epidermis	K17	TGF β /SMAD/miR-486-3p Signaling	Downregulated miR-486-3p, allowed over-expression of K17, driving keratinocyte proliferation, and thus contributes to the development of psoriasis.
miR-143	147 psoriasis patients and 120 healthy volunteers were enrolled in this clinical study.	Plasma	Bcl-2		miR-126 plays a positive role in the inhibition of inflammation, and its low concentration may allow a greater influx of inflammatory cells to enter the skin, further aggravating inflammation in psoriasis patients.
miR-424	In total, 194 psoriasis patients and 175 healthy controls were recruited.	Skin tissues/PBMCs	MEK1	miR-424 /MEK1/ cyclin E1 pathway	miR-143 expression in PBMCs is negatively correlates with disease severity in psoriasis and thus a low-expression of miR-143 in PBMCs would indicate poor prognosis for this disease.
miR-138	Skin specimens were obtained from 6 psoriasis patients and 6 healthy controls. Serum samples were taken from 15 patients with psoriasis and sex- and age- matched healthy volunteers.	Skin tissue/serum	RUNX3		Inhibiting miR-424 in normal human keratinocytes led to upregulation of MEK1 or cyclin E1 protein, and resulted in increased cell proliferation.
	40 patients with psoriasis and 35 healthy subjects were included in this study.	CD4(+) T cells			Overexpression of miR-138 inhibits RUNX3 expression and decreased the ratio of Th1/Th2 in CD4(+) T cells.

Tabla Suplementaria 3: MicroARNs regulados a la baja en psoriasis
[Ghafouri-Fard et al., 2020].

miRNA	Numbers of clinical samples (tissues, serum, etc.)	Source	Targets/Regulators	Signaling Pathways	Function and comments
miR-31	29 Psoriatic skin samples were obtained by punch biopsy and normal adult human skin specimens were taken from healthy adults undergoing plastic surgery. Biopsies were taken from nonlesional (n = 20) and lesional skin (n = 43) of patients with psoriasis and from skin of healthy individuals (n = 35).	Keratinoocytes	Ppp6c	NF- κ B signaling pathway	Ppp6c is directly targeted by miR-31 and its silencing led to an increase in the epidermis thickness and an enhanced proliferation of keratinocytes
miR-130	Specimens were collected from 12 patients with psoriasis and 8 healthy controls.	Keratinoocytes	STK40 NF- κ B p65, SOX9, p-c-Jun, p-JNK, and p-p38MAPK	NF- κ B signaling NF- κ B and JNK/MAPK signaling pathways	Overexpression of miR-31 contributes to skin inflammation in psoriasis lesions by regulating the production of inflammatory mediators and leukocyte chemotaxis to the skin. Overexpressing miR-130a strikingly promoted HaCaT cell viability and migration and inhibited apoptosis
miR-17-92	Lesional and perilesional specimens from 25 psoriasis patients and healthy skin specimens from 25 people who accepted cosmetic surgery were collected.	Keratinoocytes	CDKN2B, SOCS1	STAT1 signaling pathway	miR-17-92 cluster enhances the proliferation and the cell-cycle progression of keratinocytes and facilitates the secretion of CXCL9 and CXCL10 from keratinocytes.
miR-126	Lesional and paired non-lesional skin were collected from 102 psoriasis patients.	Keratinoocytes	C-caspase, Bcl-2, TNF- α , IFN- γ , IL-17A and IL-22	Apoptosis	Upregulation of miR-126 promotes cells proliferation and inflammation while prevents cells apoptosis in keratinocytes.
miR-146a/b	30 patients with psoriasis and 30 control subjects were included in the study.	Human epidermal keratinocytes (HEKs)	FERMT1, IRAK1, CCL5, IL-8, CARD10 and NUBP	NF- κ B signaling pathway and regulation of cell proliferation	The ability of miR-146a/b to hinder inflammatory responses, activation-induced cell death and proliferation of keratinocytes and fibroblasts proposes that miR-146a/b participate in the skin homeostasis and controlling inflammatory responses in both healthy and diseased skin.
miR-142-3p	Human keratinocytes HaCaT cells were obtained from the American Type Culture Collection. M5, a cocktail of cytokines, was used to induce psoriatic inflammation like condition in HaCaT cells. 20 psoriasis tissues and the adjacent normal tissues were analyzed. 11 patients with psoriasis and 11 healthy age- and gender-matched volunteers participated in this study.	HaCaT cells	Sema3A	miR-142-3p/Sema3A signaling	Suppression of miR-142-3p protects HaCaT cells against M5-induced hyper-proliferation and inflammatory injury by suppressing its target Sema3A.
miR-155	32 biopsies (lesional and non-lesional tissues) were obtained from patients with psoriasis. 29 patients with psoriasis and 29 control subjects were recruited. 20 patients with psoriasis and 15 healthy volunteers were recruited. A total of 63 psoriatic patients and 80 sex- and age-matched healthy controls were recruited.	Skin Samples PBMCs	PTEN, PIP3, AKT, p-AKT, Bax and Bcl-2 SOCS1, VDR	PTEN and AKT signaling pathway TLR- and IFN-signaling	Down-regulation of miR-155 significantly inhibits proliferation, migration, invasion and promotes apoptosis. Psoriasis patients presented increased expression of miR-155 in PBMCs that was correlated with Psoriasis Area Severity Index (PASI) and decreased with disease remission.
miR-21	32 biopsies (lesional and non-lesional tissues) were obtained from patients with psoriasis.	Skin Samples	TIMP-3, TACE and ADAM17	IL-6/Stat3 pathway	Blocking miR-21 and its target TIMP-3 may be a potential therapeutic strategy for treating psoriasis.
miR-200c	29 patients with psoriasis and 29 control subjects were recruited.	Skin Samples/plasma	SIRT1, eNOS and FOXO1		miR-200c correlates with the severity of disease and chronic inflammation.
miR-223	20 patients with psoriasis and 15 healthy volunteers were recruited.	Skin samples/PBMCs/HaCaT cells	PTEN	PTEN/Akt pathway	miR-223 increased proliferation and inhibited apoptosis of IL-22-stimulated keratinocytes.
miR-210	A total of 63 psoriatic patients and 80 sex- and age-matched healthy controls were recruited.	Skin lesions/PBMCs	STAT6 and LYN	TGF- β /IL-23-HIF-1 α -miR-210-STAT6/LYN pathways	Elevated miR-210 expression might participate in the CD4 ⁺ T cell-mediated immune dysfunction in peripheral and skin lesions of psoriasis.
miR-200a	18 patients with psoriasis and 18 age- and sex-matched healthy subjects were enrolled in this study.	CD4(+) T cells	FOXP3, IFN- γ , IL-17, IL-10 and TGF- β		Suppression of miR-210 increases FOXP3 expression and reverses the immune dysfunction in CD4 ⁺ T cells from patients with psoriasis.
miR-369-3p	A total of 189 patients with psoriasis and 109 healthy individuals were recruited. 40 patients with psoriasis and 40 healthy subjects were recruited in this study (serum samples were obtained from 30 and skin tissues were collected from 10 individuals in each group).	CD4(+) T cells Skin samples/Serum	ROR γ t, FOXP3 TNF, LIMP1, SIRT1, SP3, ADAM10, HES1 and WNT5A		miR-200a can change the concentrations of Th17 and Treg cells in the peripheral blood of psoriatic patients. miR-369-3p is a possible biomarker for psoriasis that can appraise the prognosis of psoriasis and may contribute to the development of new therapeutic methods.
miR-1266	Samples were obtained from 25 patients with psoriasis and 20 healthy age- and sex-matched volunteers.	Serum	IL-17A		Serum miR-1266 may have potential for a new disease marker.
miR-31	29 patients with psoriasis and 22 healthy blood donors were recruited.	Serum		Apoptosis	miR-31 and ET-1 may serve as potential biomarkers of the disease. ET-1 is made by psoriatic keratinocytes and inhibits apoptosis. Inflammation increases the production of ET-1, which in turn results in the chronic induction of keratinocyte proliferation.

Tabla Suplementaria 4: MicroARNs regulados al alza en psoriasis [Ghafouri-Fard et al., 2020].

microARN	Dianas asociadas al sistema inmune	Función asociada a la respuesta inmune	Patología autoinmune
miR-10a	MAP3K7 PMID: 20624982 PIK3CG PMID: 24522205 TRA2B PMID: 21118818 PTEN PMID: 24100613	Función de T reguladoras PMID: 23825948 Inhibición de IL-12/IL-23p40 PMID: 22068236	<i>Down-regulated</i> en AR PMID: 28782180, 29667551 <i>Down-regulated</i> en EII PMID: 25281418
miR-19a-3p	PTEN PMID: 14697198 SOCS1 PMID: 18728182 SMAD4 PMID: 19885849 TLR2 PMID: 22105995 TNF-a PMID: 21271217	Regulación de la expresión de TLR2 PMID: 22105995 Inducción de IL-13 e IL-5 PMID: 29122948	<i>Up-regulated en la fase recurrente de la EM</i> PMID: 29551498 <i>Down-regulated</i> en PS PMID: 21277746 <i>Up-regulated</i> en CU PMID: 25886994
miR-19b-3p	PTEN PMID: 21972292 TLR2 PMID: 22105995 TF PMID: 21794077	Regulación de la proliferación de células T CD4 PMID: 21972292 Promoción de Th17 a iniciar la vía PI3K-AKT-mTOR. PMID: 24644282	<i>Down-regulated</i> en LES y SAF PMID: 21794077 <i>Down-regulated</i> en AR PMID: 30348222
miR-21-5p	TIMP-3 PMID:24574341 PDCD4 PMID: 21602271, 19946272 IRAK1 PMID: 23633945 SMAD-7 PMID: 25642768 TIPE2 PMID: 24577093 FASL PMID: 24710931 SPRY1 PMID: 27533779 RASGRP1 PMID: 20483747	Regula respuestas aberrantes de células T PMID: 21602271 Regula señalización TLR4 PMID: 19946272 Promueve diferenciación Th17 PMID: 25642768 Inhibe la apoptosis de células T PMID: 27271606	<i>Up-regulated</i> en PS, LES PMID:24574341, 21602271 <i>Up-regulated</i> en LES y AR PMID: 22683424 <i>Up-regulated</i> en CU PMID: 25886994 <i>Up-regulated</i> en EG y OG 29325052, 25873777, 26943153 <i>Down-regulated</i> en DM1 PMID: 22999472 <i>Down-regulated</i> en EM PMID: 27570566 <i>Up-regulated</i> en EM PMID: 29325906
miR-23a-3p	IKKa PMID:27936459 BCLC and CXCL12 PMID: 31020662 PDE4B PMID: 30181004	RAD51 y LB1/Regula reparación de daño de ADN PMID: 30640176 Inhibe citoquinas pro-inflamatorias PMID: 30181004 Promueve ATG12/autofagia PMID: 29845275	<i>Down-regulated</i> en EG PMID:30391932 <i>Down-regulated</i> en EM primariamente progresiva PMID:29084979 <i>Down-regulated</i> en AR PMID:27936459 <i>Down-regulated</i> en EM PMID:24277735 <i>Up-regulated</i> en EII PMID: 30640176 <i>Down-regulated</i> en PsA PMID: 30181004
miR-26b-5p	PTGS2 PMID: 26371058, 20100477 PTEN PMID: 24140453, 26538296 TLR4 PMID: 26222045 GSK-3β PMID: 26088648 KPNA3 PMID: 28000846	Activa la vía Wnt/GSK-3β/β-catenin PMID: 26088648 Promueve la translocación NF-κB p65 PMID: 28000846	<i>Downregulated</i> en arthrosis PMID: 28000846 <i>Up-regulated</i> en AR PMID: 29126434 <i>Down-regulated</i> en EM PMID: 27570566
miR-27a-3p	FOXO1 PMID: 19574223 IGF1 PMID: 21643012	Función macrofágica PMID: 24835395, 426971344	<i>Up-regulated</i> en AR PMID: 28775366

	EGFR PMID: 23559009 TLR PMID: 426971344 IRAK4 PMID: 426971344 IL-10 PMID: 24835395		<i>Up-regulated en LES</i> PMID: 24509687
miR-29a-3p	PTEN PMID:23426367 FOXO3 PMID: 24467486 STAT3 PMID: 28987940 IL-12p40 PMID: 24054330	Activado por la vía de señalización de interferón PMID: 22934851	<i>Down-regulated en AR</i> PMID: 28987940
miR-93-3p	CXCL12. PMID: 28423491 NKG2DL PMID: 25277195 PDCD4 PMID: 27021515 NCOA3 PMID: 28920955	Promueve el escape inmunológico de tumores hipóxicos PMID: 28920955	Aumentado en EC PMID: 21546856 <i>Down-regulated en DM1</i> PMID: 22999472
miR-101-3p	TLR2 PMID 26022377 FOS PMID: 19008416 PTGS2 PMID: 19133256 DUSP1 PMID: 21068409 RAC1 PMID: 23592263 MTOR PMID: 22989749 JAK2 PMID: 26498873 RHOA PMID: 28109909 VHL PMID: 26841847	Inhibición de citoquinas pro-inflamatorias PMID: 31930972	<i>Down-regulated en RHD</i> PMID: 26022377 <i>Down-regulated en EG</i> PMID: 25871842 <i>Up-regulated en EC y CU</i> PMID: 25886994
miR-125b-5p	P53 PMID: 19293287 IL-6R PMID: 22824797 STAT3 PMID: 17891175 SMAD4 PMID: 22357933 ICAM-2 PMID: 23591197 TNF PMID: 26435691	Vía TRAF6/MAPKs/NF-κB en condrocitos humanos PMID: 31053727 Desarrollo de linfocitos B cell PMID: 29555645 Proliferación de queratinocitos PMID: 21412257 Activación de macrófagos PMID: 22003200	<i>Down-regulated en LES</i> PMID: 29710477 y 23305626 <i>Up-regulated en AR</i> PMID: 28738524 y 24778468 <i>Down-regulated en AR temprana</i> PMID: 27255643 <i>Down-regulated en Ps</i> PMID: 18419608
miR-126-3p	OBf.1 PMID: 19843690 VEGFR2 PMID: 24270517 LRP6 PMID: 25240815 PIK3R2 PMID: 27729613 TOM1 PMID: 20083669	Regula la homeostasis y la función de los dendrocitos plasmocitoides PMID: 24270517 Regula la respuesta Th2 PMID: 19843690	<i>Up-regulated en SS</i> PMID: 28339495 <i>Up-regulated en LES y AR</i> PMID: 22683424 <i>Down-regulated en PsA</i> PMID: 29850558 <i>Up-regulated en EM</i> PMID: 29325906
miR-127-3p	PRDM1 PMID: 19530237	No descrito	<i>Up-regulated en EM primaria progresiva</i> PMID: 29084979, 30743997
mir-142-3p	ADCY9. PMID: 19098714 RAC1 PMID: 2474394 TGFB1R1 PMID: 24558198 IL1A PMID: 22870299	Regula la activación de respuestas inmunes adaptativas guiadas por células presentadoras de antígeno PMID: 27611009	<i>Up-regulated en SS</i> PMID: 21883400 <i>Up-regulated en LES</i> PMID: 23401079 <i>Down-regulated en TPI</i> PMID: 27802180
miR-143-3p	MAPK7 PMID: 19464056 PTGS2 PMID: 24105952 AKT1 PMID: 23104321 BCL2 PMID: 23276710	IKKa PMID:27936459 BCLC y CXCL12 PMID: 31020662	<i>Up-regulated en AR</i> PMID: 28775366 <i>Up-regulated en LES</i> PMID: 24509687

	MMP13 PMID: 21427707 TNF PMID: 23804075	RAD51 y LB1/Regulación de la reparación del daño de ADN PMID: 30640176 PDE4B PMID: 30181004 Promueve ATG12/autofagia PMID: 29845275	
miR-146a- 5p	CXCR4 PMID: 20375304, 26082201 TLR2 PMID: 20375304 TRAF6, IL-1, IRAK1, and IRAK2 PMID: 19596990; FADD. PMID: 19965651 IRF-5, STAT1. PMID: 19333922 PTC1 PMID: 18474871 STAT1 PMID: 20850013 NFKB1. PMID: 18504431, 25052989 CXCL8 PMID: 18504431 CD40LG PMID: 21236257 FAS PMID: 20656888; 23645835 TLR4 PMID: 21329689	Regulación de respuestas inflamatorias PMID: 16885212 Supresión de la función T reguladora PMID: 20850013	<i>Up-regulated</i> en PS PMID: 23018031; 20840794 <i>Upregulated</i> en EG: 24554510, 29325052 <i>Upregulated</i> en AR PMID: 18438844, 18383392, 20459811, 20470394, 18759964, 21810022 <i>Up-regulated</i> en EC PMID: 25886994 <i>Down-regulated</i> en TPI PMID: 27802180 <i>Up-regulated</i> en SS y LES PMID: 28339495 <i>Down-regulated</i> en EB PMID: 31599663
miR-150-5p	MYB PMID: 17923094 CCR6 PMID: 24385540 STAT1 PMID: 26025667 STAT5B PMID: 27447965 MMP14 PMID: 25549355 CXCR4 PMID: 22039399	Regula la proliferación de queratinocitos PMID: 28399173 <i>Down-regulation</i> de SOCS-1 PMID: 23723424, PMID: 31879859 Diferenciación celular c-myc/B PMID: 27153500	<i>Down-regulated</i> en LES PMID: 31209193 <i>Down-regulated</i> en DM1 PMID: 28733034 <i>Up-regulated</i> en NiGa PMID: 29459010
miR-155-5p	TRIM32 PMID: 25128227 SOCS1 PMID: 19144316 FOXO3 PMID: 19650740 FADD PMID: 19650740 SMAD1: PMID: 20427544 ICAM1: PMID: 19949084	Homeostasis y función del sistema inmune PMID: 17463290	<i>Down-regulated</i> en AR temprana PMID: 23897768 <i>Downregulated</i> en EG PMID: 28569050 <i>Down-regulated</i> en LES PMID: 20952466 <i>Down-regulated</i> en LES juvenil PMID: 25253569 <i>Up-regulated</i> en AITD PMID: 29325052 <i>Up-regulated</i> en AR: PMID: 18383392; 20470394 <i>Upregulated</i> en EM PMID: 19952055
miR-210-3p	FOXP3 PMID 24316592	Diferenciación Th1/Th17 PMID: 29757188	<i>Down-regulated</i> en AR PMID: 28782994 <i>Up-regulated</i> en LES PMID: 28560518
mir-326	NOTCH1 PMID: 19955368 CD9MID: 19883630	Diferenciación Th17 PMID: 19838199	<i>Up-regulated</i> en EM PMID: 19838199 <i>Up-regulated</i> en LES PMID: 26861134

			<i>Down-regulated</i> en TPI PMID: 27802180 <i>Up-regulated</i> en DM1 PMID: 30194557 <i>Up-regulated</i> en EB PMID: 31599663
miR-451	IL-6R PMID: 19536157, 27461244, and 25623956 IKBKB PMID: 23740840	Inhibición de la proliferación de fibroblastos y secreción de citoquinas en AR PMID: 26823778 Quimiotaxis de neutrófilos PMID: 24574214 Regula la secreción de citoquinas en células dendríticas PMID: 23169590	<i>Up-regulated</i> en TH PMID: 29054761 <i>Up-regulated</i> en LES PMID: 22683424 <i>Up-regulated</i> en AR PMID: 22683424 <i>Down-regulated</i> en AR PMID: 24401767
miR-191-5p	IL1A PMID: 20924108	Supervivencia de células T PMID: 27634043 Desarrollo de células B PMID: 30281154	<i>Down-regulated</i> en EM PMID: 26894232 <i>Up-regulated</i> en SS PMID: 28339495 <i>Up-regulated</i> en LES PMID: 28339495
miR-30c-5p	SOCS3 PMID: 26707189 SOCS1 PMID: 22291592 RUNX2 PMID: 23316327 P53 PMID: 24029422 CASP3 PMID: 22473208 FOXO3 PMID: 26080425	No descrito	<i>Up-regulated</i> en la fase recurrente de EM PMID: 29551498 <i>Down-regulated</i> en SS PMID: 28916716

Tabla Suplementaria 5: Selección de microARNs para el estudio sérico en IMIDs (enfermedades inflamatorias mediadas por la respuesta inmune). IL: interleuquina, TLR: Receptor Toll-like, AR: Artritis Reumatoide, EI: Enfermedad inflamatoria intestinal, EM: Esclerosis múltiple, PS: Psoriasis, CU: Colitis ulcerosa, LES: Lupus sistémico eritematoso, SAF: Síndrome antifosfolípido, EG: Enfermedad de Graves, OG: Oftalmopatía de Graves, DM: Diabetes mellitus, PsA: Artritis psoriásica, EC: Enfermedad de Crohn, RHD: Cardiopatía reumatológica, SS: Síndrome de Sjögren, TPI: Trombocitopenia inmune, EB: Enfermedad de Behçet, NlgA: Nefropatía por IgA, AITD: Enfermedad tiroidea autoinmune, TH: Tiroiditis de Hashimoto.

Psoriasis Area and Severity Index (PASI); a quantitative rating scale for measuring the severity of psoriatic lesions based on area coverage and plaque appearance. Please complete **all** sections of the table and shade in the affected areas on the body diagrams below.

Plaque characteristic	Rating score	Body region (and weighting factor)			
		Head	Upper Limbs	Trunk	Lower Limbs
Erythema	0 = None 1 = Slight				
Thickness	2 = Moderate 3 = Severe				
Scaling	4 = Very severe				
Add together each of the 3 scores for each of the body regions to give 4 separate sub totals.					
Sub Totals		A1=	A2=	A3=	A4=
Multiply each sub total by amount of body surface area represented by that region i.e. A1 x 0.1 for head, A2 x 0.2 for upper limbs, A3 x 0.3 for trunk, A4 x 0.4 for lower limbs to give a value B1, B2, B3 and B4 for each body region respectively					
		A1 x 0.1 = B1	A2 x 0.2 = B2	A3 x 0.3 = B3	A4 x 0.4 = B4
		B1=	B2=	B3=	B4=
Degree of involvement as % for each body region affected; (score each region with score between 0–6)	0 = None				
	1 = 1–9%				
	2 = 10–29%				
	3 = 30–49%				
	4 = 50–69%				
	5 = 70–89%				
For each body region multiply sub total B1, B2, B3 and B4 by the <u>score</u> (0–6) of the % of body region involved to give 4 subtotals C1, C2, C3 and C4					
		B1 x score = C1	B2 x score = C2	B3 x score = C3	B4 x score = C4
		C1=	C2=	C3=	C4=
The patient's PASI score is the sum of C1+C2+C3+C4				PASI=	

Please shade in the affected areas

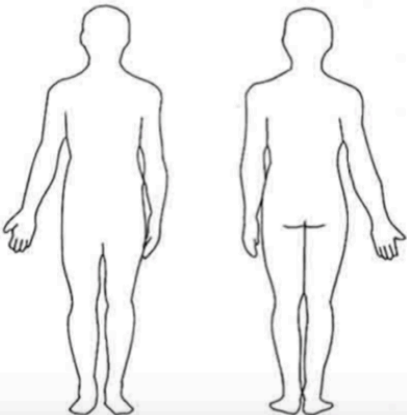


Figura Suplementaria 1: Hoja de cálculo del índice de severidad y área de la psoriasis (PASI). Este índice combina la valoración de cada lesión de psoriasis del 0 al 4 (0=ninguno, 1=leve, 2=moderado, 3=marcado, 4=muy marcado) con base en tres parámetros: eritema, infiltración y descamación, así como una evaluación ponderada del área que afecta

dividido el cuerpo en partes, es decir, cabeza, tronco, extremidades superiores y extremidades inferiores. La valoración de intensidad más utilizada del PASI es considerar leve a los pacientes entre 0-5, moderada de 5-10 y grave en los PASI mayores de 10. Se trata del sistema más utilizado, dado que muestra una buena correlación y un bajo índice de variabilidad entre observadores, permitiendo su realización de forma bastante rápida y siendo el más usado históricamente en los ensayos clínicos para la aprobación de fármacos biológicos. Aparte del uso habitual del PASI de un paciente en un momento dado, son muy utilizados como índices de eficacia los llamados PASI50 o PASI 75. El PASI50 es el valor PASI que supone un 50% del valor del PASI basal de un paciente, es decir, que un paciente alcance un PASI50 supone que su PASI actual es al menos un 50% menor que su PASI basal al inicio de un determinado tratamiento. Equiparable es el PASI75, disminución del 75% del PASI basal o el PASI90, considerado actualmente por algunos como el paradigma de eficacia en los estudios que evalúan los nuevos fármacos biológicos y que supone que un paciente que lo alcance tiene como valor máximo del PASI actual el 10% del valor del PASI que tenía inicialmente [Fredriksson et al., 1978; Chalmers., 2015].

10.6. Financiación.

Este trabajo ha sido apoyado por las siguientes becas:

Proyectos de Investigación en Salud (FIS) PIE13-0041, PI16-02091 y PI19-00584, Plan Nacional de Salud SAF2017-82886-R (financiados por Ministerio de Economía y Competitividad -MINECO-), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII): PI17/01972, TIRONET2-CM, B2017/BMD-3724 (financiado por la Comunidad de Madrid), Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Cardiovasculares (CIBERCV) y Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER): GCV14/ER/12.

También mediante subvenciones RD16/0011/0012, PI17/01972 y PI18/0371 (MINECO, ISCIII).

Por último, esta investigación ha sido co-financiada por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER), Fundación BBVA a equipos de Investigación Científica 2018 y Fundación Bancaria Caixa con el código de proyecto HR17-00016.